

AUS DEM RUDOLF-ZENKER-INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE CHIRURGIE
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT ROSTOCK

DIREKTORIN: UNIV.-PROF. DR. MED. BRIGITTE VOLLMAR

DIE WIRKUNG VON METFORMIN AUF NEURODEGENERATIVE PROZESSE IN DER APOE-/- MAUS

INAUGURALDISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOKTOR DER MEDIZIN
DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON

ELAINE BRICHMANN | GEB. AM 03.08.1987 IN BERLIN

NEPTUNALLEE 7

ROSTOCK | SEPTEMBER 2019

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00002820

DOKTORARBEIT

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

Vorabveröffentlichung der Dissertation:

Kuhla A, **Brichmann E**, Rühlmann C, Thiele R, Meuth L, Vollmar B. Metformin therapy aggravates neurodegenerative processes in ApoE^{-/-} mice. J Alzheimer's Dis. 23. April 2019;68(4):1415-27

GUTACHTER: PD DR. ANGELA KUHLA

**RUDOLF-ZENKER-INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE CHIRURGIE
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK**

PROF. DR. MED. MARKUS TIEDGE

**INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE BIOCHEMIE UND MOLEKULARBIOLOGIE
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK**

PROF. DR. HANS J. GRABE

**KLINIK UND POLIKLINIK FÜR PSYCHIATRIE UND PSYCHOTHERAPIE
UNIVERSITÄTSMEDIZIN GREIFSWALD**

JAHR DER ABGABE: 2019

JAHR DER VERTEIDIGUNG: 2020

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
1.1	METFORMIN	1
1.2	ALZHEIMER-KRANKHEIT	2
1.3	APOE-POLYMORPHISMUS UND APOE KNOCK-OUT MÄUSE	2
1.4	DYSLIPIDÄMIE.....	4
1.4.1	LIPOGENESE	5
1.4.2	LIPOLYSE	5
1.5	FIBROBLAST GROTH FACTOR 21	6
1.6	KALORIENRESTRIKTION.....	7
1.7	ZIELSETZUNG	8
II.	MATERIAL UND METHODE	10
2.1	TIERE UND TIERHALTUNG.....	10
2.2	VERSUCHSABLAUF	10
2.3	ORGANENTNAHME	11
2.4	ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)	11
2.5	TRIGLYZERID ASSAY	12
2.6	CHOLESTERIN ASSAY	12
2.7	GENEXPRESSIONSANALYTIK.....	12
2.7.1	RNA-ISOLIERUNG.....	13
2.7.2	PHOTOMETRISCHE QUANTIFIZIERUNG.....	13
2.7.3	cDNA-HERSTELLUNG.....	13
2.7.4	REAL-TIME QUANTITATIVE POLYMERASE-KETTENREAKTION (RT-QPCR).....	14
2.7.5	RELATIVE QUANTIFIZIERUNG DER GENEXPRESSION	16
2.8	PROTEINANALYTIK	16
2.8.1	PROTEINISOLIERUNG	17
2.8.2	PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG	17
2.8.3	SDS-PAGE	18

2.8.4	SEMI-DRY-WESTERN-BLOT.....	19
2.8.5	IMMUNDETEKTION.....	21
2.9	IMMUNHISTOLOGIE.....	22
2.10	STATISTIK	23
III.	ERGEBNISSE	24
3.1	TRINKMENGE.....	24
3.2	METFORMINDOSIS	25
3.3	KÖRPERGEWICHT	26
3.4	BLUTZUCKER.....	28
3.5	FGF21 KONZENTRATIONEN IM BLUTPLASMA	28
3.6	FGF21-PAMPK-MTOR SIGNALWEG (IM 18 WOCHEN EXPERIMENT).....	30
3.7	NEURODEGENERATION UND -INFLAMMATION	31
3.7.1	TAU	31
3.7.2	NEUN	33
3.7.3	PSD-95.....	34
3.7.4	GFAP.....	35
3.8	EINFLUSS VON METFORMIN AUF DEN PERIPHEREN FETTSTOFFWECHSEL.....	36
3.9	LIPOGENESE IM GEHIRN.....	37
3.9.1	LIPIDSYNTHESE	37
3.9.2	CHOLESTERINSYNTHESE.....	39
3.10	LIPOLYSE	40
3.11	LIPIDEFFLUX.....	43
IV.	DISKUSSION.....	45
4.1	SCHLUSSFOLGERUNG	50
V.	ZUSAMMENFASSUNG	52
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	53
VII.	THESEN	63
VIII.	DANKSAGUNG.....	64
IX.	LEBENS LAUF	65

X.	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	67
-----------	--	-----------

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: FGF21-pAMPK-mTOR Signalweg.....	8
Abbildung 2: Die durch Metformin beeinflussten Signalwege.....	9
Abbildung 3: Darstellung des Versuchsablaufes	10
Abbildung 4: Durchschnittliches Körpergewicht der Versuchstiere im 6, 12 und 18 Wochen Experiment.....	26
Abbildung 5: Metformin zeigte keinen Einfluss auf die spontanen Blutzuckerwerte.....	28
Abbildung 6: ApoE ^{-/-} Tieren tranken signifikant mehr als der Wildtyp.....	24
Abbildung 7: Metformin zeigt einen signifikanten Einfluss auf die FGF21 Plasmakonzentration in der ApoE ^{-/-} Maus.....	29
Abbildung 8: Metformin führte zu keiner Aktivierung des FGF21-pAMPK-mTOR Signalweges.....	30
Abbildung 9: Tendenzielle Erhöhung von pTau durch Metformin.....	32
Abbildung 10: Tendenzieller Verlust an Neuronen durch Metformin.....	33
Abbildung 11: Metformin führte zum Synapsenverlust.....	34
Abbildung 12: Zunahme der neuronalen Entzündung durch Metformin.....	35
Abbildung 13: Metformin führte zu höheren Triglyzeridwerte.....	36
Abbildung 14: Metformin führte zu einem nicht signifikanten Anstieg der Cholesterinwerte.....	37
Abbildung 15: Tendenzielle Erhöhung der Enzyme der Lipidsynthese durch Metformin.....	38
Abbildung 16: Metformin zeigte keinen Einfluss auf die Cholesterinsynthese.....	39
Abbildung 17: Metformin führte zu keiner erhöhten peroxisomalen β -Oxidation.....	41
Abbildung 18: Metformin führt zu keiner erhöhten mitochondrialen β -Oxidation.....	42
Abbildung 19: Keine sigifikante Erhöhung des Lipieffluxs durch Metformin.....	43
Abbildung 20: Die Wirkung von Metformin in der ApoE ^{-/-} Maus.....	51

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Zusammensetzung des Denaturierungsansatzes.....	14
Tabelle 2: Zusammensetzung des RT-Mastermixes.....	14
Tabelle 3: Primerpaare für die RT-qPCR, fwd = Forward Primer, rev = Reverse Primer.....	15
Tabelle 4: Zusammensetzung RT-qPCR Mastermix.....	15
Tabelle 5: Lightcyclerprogramm, Zyklus 2 bis 4 wurden 40x wiederholt.....	16
Tabelle 6: Zusammensetzung des Lysepuffers.....	17
Tabelle 7: Zusammensetzung SDS-Gel.....	18
Tabelle 8: Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers.....	19
Tabelle 9: Zusammensetzung des Probenpuffers (2x).....	19
Tabelle 10: Zusammensetzung der Transferpuffer.....	20
Tabelle 11: Zusammensetzung TBS.....	20
Tabelle 12: Zusammensetzung TBST.....	21
Tabelle 13: Primärantikörper (Cell Signaling®).....	21
Tabelle 14: Sekundärantikörper (Cell Signaling®).....	22
Tabelle 15: Zusammensetzung der Strip-Lösung.....	22
Tabelle 16: Antikörper der immunhistologischen Auswertung.....	23
Tabelle 17: Rechnerisch ermittelte mittlere Tagesdosis der jeweiligen Versuchsgruppen....	25

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
ABCA1	<i>engl.</i> ATP-binding Cassette Transporter A1
ACOX1	Acyl-Coenzym A Oxidase 1
AD	Alzheimer-Krankheit (<i>engl.</i> Alzheimer's disease)
AMPK	Adenosinmonophosphat abhängige Kinase
ANOVA	Varianzanalyse (<i>engl.</i> analysis of variance)
ApoE	Apolipoprotein E
ApoE-/-	Apolipoprotein E knockout
APP	Amyloid-Vorläuferprotein (<i>engl.</i> Amyloid-Precursor-Protein)
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CPT	Carnitin palmitoyltransferase
CR	Kalorienrestriktion (<i>engl.</i> calorie restriction)
CRP	C-reaktives Protein
Cu	Kupfer
DM	Diabetes mellitus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dtl.	Deutschland
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>engl.</i> Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	und andere (<i>lat.</i> Et alii)
FAS	Fettsäuresynthase (<i>engl.</i> fatty acid synthase)
FGF21	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 21 (<i>engl.</i> fibroblast growth factor 21)
g	Gramm
GFAP	saures Gliafaserprotein (<i>engl.</i> glial fibrillary acidic protein)
glut-1	Glukosetransporter-1
HDL	High Density Lipoprotein
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HRP	Meerrettichperoxidase

H ₂ O _{DEPC}	Diethylcarbonat-Wasser
IDF	International Diabetes Federation
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LXR α	Liver X Rezeptor α
LXRE	LXR response element
mA	Miliampere
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
mg	Miligramm
ml	Mililiter
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
MW	Mittelwert
n	Anzahl (<i>engl.</i> Number)
Na	Natrium
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NeuN	(<i>engl.</i> Neuronal Nuclei)
nm	Nanometer
p	Signifikanzwert (<i>engl.</i> Probability)
pAMPK	phosphorylierte AMPK
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>engl.</i> polymerase chain reaction)
pFGFR1c	phosphorylierter FGF Rezeptor 1c
pg	Pikogramm
PGC-1 α	<i>engl.</i> peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator 1 α
pmTOR	phosphoryliertes mTOR
PPAR	Peroxisom-Proliferator-Aktivator-Rezeptor
PSD95	<i>engl.</i> postsynaptic density protein 95
PSEN	Präsenilin
pTau	phosphoryliertes Tau
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Drehzal (<i>engl.</i> rounds per minute)
RPS	Ribosomal Protein S
RT-QPCR	real time quantitative Polymerase-Kettenreaktion

RXR	Retinoid X Rezeptor
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
SEM	<i>engl.</i> standard errors of mean
SREBP	<i>engl.</i> sterol regulatory element binding protein
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
wt	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
°C	Grad Celcius

I. EINLEITUNG

1.1 METFORMIN

Metformin ist ein orales Antidiabetikum und das Medikament der ersten Wahl zur Behandlung des Diabetes mellitus (DM) Typ 2 (1). Mit DM Typ 2 ist eine Insulinresistenz assoziiert. Dabei ist das Insulin nicht in der Lage über Insulinrezeptoren und der nachfolgenden Signalkaskade die multiplen physiologischen metabolischen Funktionen auszuführen. Der genaue Mechanismus ist ungeklärt. Es wird vermutet, dass es durch eine Störung des Insulinrezeptors oder nachfolgender Moleküle der intrazellulären Signalkaskade verursacht wird (2). Durch die fehlende Insulinwirkung kommt es schließlich zu pathologisch erhöhten Blutzuckerwerten. Das firstline Medikament Metformin führt unter anderem zu einer Reduzierung der Insulinresistenz, sowie einer Reduktion der hepatischen Glukoneogenese (3,4). Auch auf den Lipidmetabolismus zeigt Metformin einen positiven Einfluss, indem es die Lipidsynthese hemmt und zur Gewichtsreduktion beiträgt (5,6).

Die pleiotropen Wirkungen des Metformins werden über die Adenosinmonophosphat abhängige Kinase (AMPK) vermittelt (7). AMPK gilt als sensitiver Sensor für den Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) und wird durch die Abnahme der ATP-Konzentration aktiviert. Nachfolgend werden durch AMPK katabolische Stoffwechselwege angeregt (8). Es kommt folglich zur verstärkten β -Oxidation von Fettsäuren und zur Inhibierung der Cholesterin- und Glukosebiosynthese (9). Die Aktivierung von AMPK durch Metformin erfolgt nicht auf direktem Weg. Es gibt unterschiedliche Hypothesen über den möglichen Wirkmechanismus. Es konnte gezeigt werden, dass Metformin sekundär über die Hemmung des Komplexes 1 der mitochondrialen Atmungskette fungiert (10). Ouyang et al. (2011) postulieren, dass Metformin die AMP Desaminase hemmt und so zu einer Aktivierung der AMPK beiträgt (11).

In Studien an einem diabetischen Mausmodell konnte des Weiteren für Metformin eine neuroprotektive Wirkung aufgezeigt werden. Unter anderem soll es zur Reduzierung vom phosphorylierten Tau und zur Steigerung der synaptischen Plastizität geführt haben (12). Phosphoryliertes Tau und der Verlust der synaptischen Plastizität gehören zu den zentralen pathognomonischen Eigenschaften der Alzheimer-Krankheit (*engl.* Alzheimer's disease, AD).

1.2 ALZHEIMER-KRANKHEIT

Die AD ist eine langsam progressive neurodegenerative Erkrankung, die mit Symptomen wie Gedächtnisverlust, Orientierungsverlust, Aphasie und psychosozialen Veränderungen einhergeht (13). Es ist die Demenzform mit der gegenwärtig höchsten Prävalenz und damit eine die Menschheit im Alter zunehmend betreffende Erkrankung (14,15). Der neurodegenerative Prozess beginnt bereits ca. 20 Jahre bevor die Erkrankung symptomatisch wird (16). Der genaue Mechanismus, wie es zur Entstehung der Krankheit kommt, ist noch nicht in Gänze geklärt. Charakteristische histopathologische Korrelate der AD sind extrazelluläre senile Plaques aus β -Amyloid, neurofibrilläre Tangles aus hyperphosphorylierten Tau-Proteinen, sowie der Verlust von Neuronen und Synapsen (13). β -Amyloide sind Peptide bestehend aus 39 bis 43 Aminosäuren, die enzymatisch vom physiologisch vorkommenden transmembranen Amyloid-Precursor-Protein (APP) abgespalten werden. Kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Synthese und Abbau des β -Amyloids zu Gunsten der Synthese, entstehen Plaques, die wiederum einen inflammatorischen Prozess induzieren. In der Summe kann dies über Neuronensterben zu einer Hirnatrophie führen (17). Das Protein Tau gehört zu den microtubuli associated proteins (MAP) und führt durch die Bindung an Mikrotubuli zu dessen Aufbau und Stabilisation. Hyperphosphoryliertes Tau löst sich jedoch vom Mikrotubuli ab und formt die neurofibrillären Tangles. Gleichzeitig verliert das Mikrotubuli an Stabilität, wodurch der axonale Transport gestört wird (18).

Man unterscheidet zwischen einer familiären und einer sporadischen Form der AD. Die familiäre AD, die bereits im mittleren Alter auftreten kann, wird autosomal dominant vererbt. Ursächlich sind hier Mutationen im APP-Gen, im Präsenilin1-Gen (PSEN1) oder PSEN2-Gen, die verantwortlich sind für ein vermehrtes Aufkommen von β -Amyloid (19,20). Auch der sporadischen Form können genetische Risikofaktoren zugrunde liegen. Hier spielt vor allem das Apolipoprotein E (ApoE) eine Rolle, das im großen Umfang im Gehirn exprimiert wird und am Cholesterintransport beteiligt ist (21,22). Das Vorhandensein der Isoform ApoE ϵ 4 gilt als Risikofaktor für die Entstehung der AD, da es im Vergleich zu den anderen Isoformen die geringste Effektivität im Cholesterintransport aufweist (23).

1.3 APOE-POLYMORPHISMUS UND APOE KNOCK-OUT MÄUSE

Apolipoprotein E (ApoE) ist ein Plasmaprotein, das in den meisten Organen synthetisiert wird, allen voran in der Leber und im Gehirn (24). Im Gehirn wird es vorrangig in den Astrozyten synthetisiert (25). Auch Neuronen sind zur Synthese von ApoE fähig, so kann

zum Beispiel ein neuronaler Schaden als Trigger für die Synthese fungieren (26). Das Vorhandensein von ApoE ist nötig, um neuronale Strukturen aufrechtzuerhalten und Cholesterin zwischen den Zellen im Gehirn zu transportieren (27,28). Für das ApoE-Gen gibt es 3 unterschiedliche Allele: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$, das Allel $\epsilon 3$ ist am häufigsten vorhanden (24). Wie bereits erwähnt, wird mit der AD das Allel $\epsilon 4$ assoziiert. Es gilt als Risikofaktor und ist bei 15% der Bevölkerung vorhanden. Personen, die ein $\epsilon 4$ Allel tragen, haben eine 3- bis 4-fach höheres Risiko an AD zu erkranken als Individuen ohne ein $\epsilon 4$ Allel (29). AD-Patienten, die dieses Allel besitzen, zeigen eine erhöhte Anzahl an Amyloid-Plaques, sowie vermehrt neurofibrilläre Tangles (30). Demzufolge könnte ein gestörter Cholesterintransport zur Akkumulation führen, welches die Entstehung einer AD begünstigt. Die ApoE knockout (ApoE^{-/-}) Maus ist mit dieser genetischen Prädisposition vergleichbar und wird daher als Mausmodell zur Untersuchung dieser Disposition und deren Pathophysiologie eingesetzt.

ApoE^{-/-} Mäuse weisen im Vergleich zu den C57BL/6 Mäusen (deren genetischer Hintergrund im folgenden als Wildtyp bezeichnet) einen altersabhängigen Verlust von synaptischen und dendritischen Strukturen auf (27). Des Weiteren führt die ApoE-Defizienz zu einer Hyperphosphorylierung von Tau, was eine Reduzierung der Stabilität von Mikrotubuli nach sich zieht und zur Bildung von neurofibrillären Tangles beiträgt (4,17). Hier handelt es sich demnach um typische Merkmale der AD.

Außerdem zeigen ApoE^{-/-} Mäuse einen erhöhten Plasmacholesterinspiegel auf, weshalb sie im Alter signifikant häufiger an Atherosklerose erkranken (32). Sie dienen daher auch als Mausmodell für die Atherosklerose. Das sich im Plasma befindende Cholesterin kann die Blut-Hirn-Schranke normalerweise nicht überwinden. Jedoch kann eine Hypercholesterinämie im Sinne einer Dyslipidämie sowie die ApoE Defizienz zu einer Störung der Blut-Hirn-Schranke führen und diese so für Cholesterin passierbar machen (33,34). ApoE ist zudem auch an der intrazellulären Cholesterinhomöostase beteiligt, welche durch *de novo* Synthese, Influx und Efflux aufrechterhalten wird. Überschüssiges Cholesterin wird mit dem ATP-Binding-Cassette-Transporter A1 (ABCA1) aus der Zelle entfernt (Efflux). Mit Hilfe von HDL und ApoE wird das Cholesterin zur Leber transportiert (reverser Cholesterintransport) und über die Gallensäure ausgeschieden (35). Ohne ApoE besteht die Möglichkeit, dass das Cholesterin im Gehirn akkumuliert. Folglich kann eine ApoE Defizienz, die mit dem Vorliegen des Allels $\epsilon 4$ vergleichbar ist, die Entstehung einer Dyslipidämie fördern. Eine Dyslipidämie wiederum kann zu neuronalen Entzündungsprozessen mit konsekutiver Neurodegeneration führen (36).

1.4 DYSLIPIDÄMIE

Eine Dyslipidämie ist definiert als eine Störung eines oder mehrerer Lipoproteine im Blut, wie z.B. erhöhte Cholesterin-, LDL- und/oder Triglyzeridwerte und wird mit der Entstehung von AD in Verbindung gebracht (37,38). In einer Studie von Zambón et al. (2010) konnte gezeigt werden, dass Patienten, die an einer familiären Hypercholesterinämie erkranken, signifikant häufiger unter einer milden kognitiven Störung leiden. Das Risiko, dass es weiterführend zur Entwicklung einer AD kommt, beträgt bis zu 15 % pro Jahr (39). Der dahinter stehende Mechanismus ist noch immer nicht geklärt. Man vermutet, dass ein erhöhter Cholesterinspiegel zu einem Anstieg der β -Amyloid Synthese und zur Tau Hyperphosphorylierung führt (40). Weitere epidemiologische Studien konnten diese Hypothese unterstützen. Diese zeigten, dass Patienten, die Statine einnehmen, ein geringeres Risiko aufweisen an einer Demenz zu erkranken. Statine wiederum sind Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase und werden eingesetzt, um den Cholesterinspiegel zu senken (41). Eine Hypercholesterinämie führt außerdem zur Akkumulation von Cholesterin in Zellen, wie zum Beispiel in Makrophagen, was indes einen entzündlichen Prozess auslösen kann. Ein Vorgang, der vor allem aus der Pathophysiologie der Atherosklerose bekannt ist (42). Möglicherweise kann ein erhöhtes Cholesterin auch im Gehirn eine Entzündung auslösen und dadurch die Entwicklung von AD fördern. Ein nichtspezifischer Marker für eine Entzündung ist das C-reaktive Protein (CRP). Hohe Serumwerte konnten ebenfalls mit einem erhöhten Risiko an AD zu erkranken, in Zusammenhang gebracht werden (43). Chronische Entzündungsprozesse im Gehirn spielen eine wichtige Rolle im neuronalen Zelltod und bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie der AD. Man vermutet, dass viele Erkrankungen über die Systembeteiligung an entzündlichen Prozessen im Gehirn beteiligt sind. Im Zuge dessen werden auch antiinflammatorische Medikamente untersucht, die möglicherweise den Zustand der chronischen Inflammation im Gehirn abmildern oder gar unterbinden können (44,45).

Im Vergleich zu anderen Organen besteht das Gehirn zu einem großen Anteil aus Lipiden. Sie sind essentiell für die Hirnfunktion. Cholesterin spielt zum Beispiel bei der Synaptogenese eine entscheidende Rolle, sowie bei dem Aufbau der isolierenden Myelinschicht (46). Fettsäuren sind ebenfalls wichtige Bestandteile von Zellmembranen und dienen als Ausgangsmoleküle für Signalstoffe (47). Kommt es jedoch zu einer Dysbalance zwischen Fettsäureaufbau (Lipogenese) und Fettsäureabbau (Lipolyse) im Sinne einer Dyslipidämie, kann es zu Störungen der Hirnstruktur und -funktion kommen. Daher ist die periphere als auch die neuronale Regulation des Lipidstoffwechsels von zentraler Bedeutung.

1.4.1 LIPOGENESE

Cholesterin und Fettsäuren werden vorrangig in der Leber synthetisiert, jedoch kann das periphere Cholesterin physiologisch die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren. Im Gehirn findet daher, vor allem in den Astrozyten, eine *de novo* Cholesterinbiosynthese statt (28). Fettsäuren dagegen können die Blut-Hirn-Schranke überschreiten. Dennoch ist das Gehirn in der Lage auch eine Fettsäuresynthese durchzuführen (48). Beide Biosynthesewege werden durch den Transkriptionsfaktor sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) reguliert (49). Dieser bindet an die Promoterregionen für Gene, die für Enzyme der Cholesterinbiosynthese und der Fettsäuresynthese kodieren und aktiviert dessen Transkription. SREBP-1a/c verstärken überwiegend die Expression von Genen, die an der Fettsäuresynthese involviert sind, während SREBP-2 vorrangig die Cholesterinbiosynthese aktiviert (50–52).

SREBP-1c wiederum wird vom Liver X receptor α (LXR α) aktiviert, einem nuklearen Rezeptor, der ebenfalls eine zentrale Rolle in der Regulation der Lipogenese spielt. Ein endogener Ligand dieser Rezeptoren ist das Oxysterol, ein Cholesterinderivat. Die Aktivierung von LXR α führt über die Bindung an LXR response element (LXREs) zur Genexpression von SREBP-1c und konsekutiv zur Erhöhung der Plasmatriglyzeridkonzentration (50,53). Ein erhöhter Cholesterinbedarf aktiviert dagegen SREBP-2. Folglich wird durch SREBP-2 die Expression der HMG-CoA-Reduktase und -Synthase gesteigert und die Cholesterinbiosynthese initiiert (49).

1.4.2 LIPOLYSE

Während einer Fastenperiode oder in Phasen, in denen hohe Mengen an Energie benötigt werden, werden durch die Lipolyse Fettsäuren und Glycerol als Energielieferanten bereitgestellt (54). Die durch den Abbau von Triglyceriden entstehenden Fettsäuren können nachfolgend vom Organismus zur β -Oxidation und Energiegewinnung genutzt werden. Das dabei entstehende Acetyl-CoA kann entweder in den Citratzyklus eintreten oder der Ketogenese als Substrat dienen (55).

Die β -Oxidation findet in den Mitochondrien und Peroxisomen statt. Eine komplette β -Oxidation von Fettsäuren zu Kohlenstoffdioxid und Wasser erfolgt jedoch nur in den Mitochondrien, da den Peroxisomen die nötigen Enzyme fehlen (56). Als Hauptaktivator der β -Oxidation gilt der Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor alpha (PPAR α) (56). PPARs gehören zu den intrazellulären Rezeptoren, die mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR)

ein Heterodimer bilden und die Genexpression von Genen regulieren, die am Lipid- und Glukosemetabolismus beteiligt sind (57). PPAR γ kann ebenfalls die β -Oxidation stimulieren und wird zudem im Gehirn exprimiert, daher spielt es vermutlich eine Rolle in der neuronalen Lipolyse (58,59).

Ebenfalls am mitochondrialen Fettsäureabbau beteiligt sind unter anderem der peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 α (PGC-1 α) und carnitine palmitoyltransferase (CPT). PGC-1 α stimuliert die Expression von CPT-1A (60). Auch eine Aktivierung durch PPARs ist möglich. Die CPT-1A katalysiert den Transport der Fettsäure durch die äußere mitochondriale Membran in den Membranzwischenraum und gilt daher als Schlüsselenzym der mitochondrialen β -Oxidation. CPT2 befindet sich in der inneren Membran des Mitochondriums und transportiert die Fettsäure weiter in das Mitochondrium (55). In der peroxisomalen β -Oxidation gilt die Acyl-Coenzym A Oxidase (ACOX1) als das Schlüsselenzym. Es katalysiert den ersten Schritt der β -Oxidation und kann unter anderem durch PPAR α aktiviert werden (56). Demzufolge spielen PPARs bei der Aktivierung der mitochondrialen, als auch der peroxisomalen β -Oxidation eine entscheidende Rolle. Die Transkriptionsrate von PPAR γ und folglich die Lipolyse können wiederum durch den Einfluss von Fibroblast growth factor 21 gesteigert werden (61).

1.5 FIBROBLAST GROTH FACTOR 21

Fibroblast growth factor 21 (FGF21) ist ein Wachstumsfaktor, der vor allem in der Leber und in Adipozyten synthetisiert wird und an der Regulation multipler metabolischer Vorgänge beteiligt ist (62). Neben der erhöhten Transkription von PPAR γ führt FGF21 auch zur gesteigerten Aktivität von PGC-1 α und reguliert somit unter anderem die β -Oxidation (61,63). Durch die gesteigerte Ketogenese und β -Oxidation führt FGF21 zu einer Reduzierung der Triglyzeride, was zu einer signifikanten Gewichtsreduktion führen kann. LXR α ist ebenfalls ein wichtiger Regulator der Lipidhomöostase und seine Expression kann durch FGF21 erhöht werden (64). LXR α kann durch die Aktivierung von ABCA1 den Lipidefflux steigern und somit einer Lipidakkumulation entgegen wirken (35). Außerdem führt FGF21 zur Inhibierung von SREBP-2, wodurch es wiederum die Cholesterinbiosynthese hemmt (65). FGF21 reguliert demnach unterschiedliche Signalstoffe, die im Lipidstoffwechsel eine wichtige Rolle spielen. Desweiteren bewirkt FGF21 im Glukosestoffwechsel unter anderem eine erhöhte zelluläre Glukoseaufnahme und eine erhöhte Insulinsensitivität. FGF21 steht daher im Fokus als möglicher Therapieansatz vom metabolischen Syndrom (63,66,67). Folglich wäre es möglich, dass durch den Einfluss von FGF21 auf die Dyslipidämie eine Neuroinflammation mit konsekutiver Neurodegeneration reduziert wird.

FGF21 selber wirkt über unterschiedliche Signalwege regulierend auf den Metabolismus ein. Die FGF21 Aktivität wird durch die Bindung an einen FGF Rezeptor, bei simultaner Bindung von β -Klotho als Transmembranprotein, vermittelt (68). Via einer Phosphorylierung sorgt dies unter anderem für die Aktivierung von AMPK (69). Es konnte bereits in tierexperimentellen Studien gezeigt werden, dass auch Metformin zu einer Erhöhung der FGF21 Plasmakonzentration führen kann (70). Möglicherweise kommt es durch Metformin via FGF21 zur AMPK-Aktivierung. Physiologisch kommt es jedoch vor allem durch Fasten und während einer ketogenen Diät zu einer erhöhten FGF21 Synthese (71).

1.6 KALORIENRESTRIKTION

Es gilt als bewiesen, dass eine Kalorienrestriktion (CR) vor altersabhängigen neuronalen Schäden schützen kann. Eine CR kann die Neurogenese induzieren, die synaptische Plastizität verbessern und kognitive Einschränkungen reduzieren (72,73).

Rühlmann et al. (74) konnten in vorangegangenen Experimenten an der ApoE^{-/-} Maus zeigen, dass sich eine Kalorienrestriktion protektiv auf die Ausbildung neurodegenerativer Erkrankungen auswirkt. Eine CR bewirkte eine Hochregulierung der endogenen FGF21-Synthese, welches über die Aktivierung von AMPK zur Hemmung vom mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) führt und letztlich zu einer Reduktion von pTau und zur Erhöhung der synaptischen Plastizität beiträgt. mTOR ist eine Kinase mit multiplen Funktionen. mTOR ist zum Beispiel an der Regulation physiologischer Prozesse wie der Genexpression, dem Zellwachstum und dem Energiehaushalt beteiligt (75). Studien konnten auch eine Beteiligung von mTOR an der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen, wie der AD, zeigen. Die Entstehung von fibrillären Tangles wird mit der Aktivität von mTOR assoziiert. Eine Inhibition von mTOR kann unter anderem zu einer Reduzierung von hyperphosphoryliertem Tau und zur Steigerung der synaptischen Plastizität führen (76–78). Diesem neuroprotektiven Signalweg via dem Fibroblast growth factor 21 (FGF21) und der Inhibition von mTOR durch AMPK widmet sich unter anderem auch diese Studie. Dabei soll untersucht werden, ob Metformin auch, wie in Abb.1 dargestellt, über FGF21 zur Aktivierung von AMPK führen kann und auf diesem Weg zur Reduktion neurodegenerativer Prozesse führt.

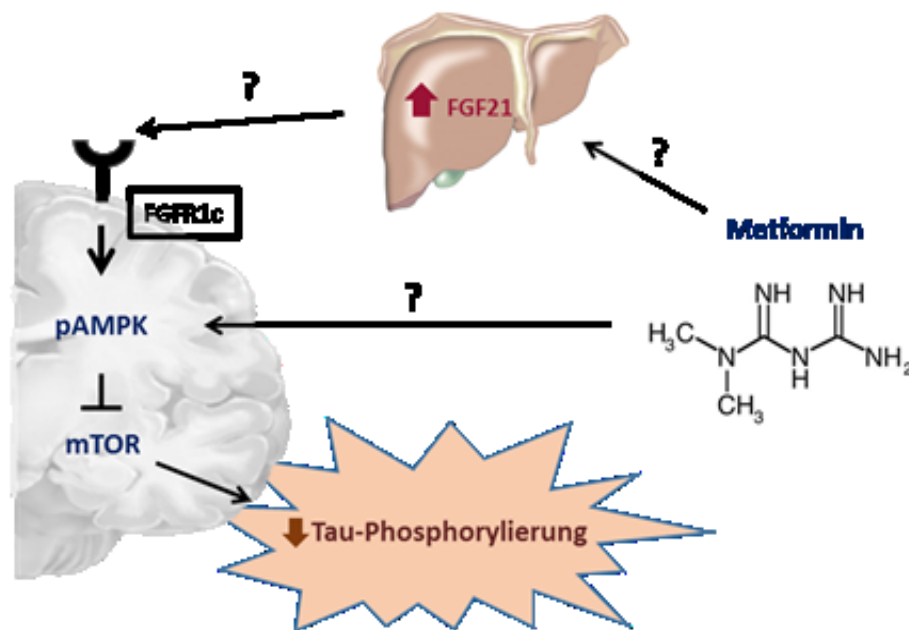


Abbildung 1: FGF21-pAMPK-mTOR Signalweg. Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, ob es durch Metformin zu einem Anstieg an FGF21 mit konsekutiver Aktivierung des FGFR1c kommt. Des Weiteren soll untersucht werden, ob es direkt oder indirekt durch Metformin zu einer Aktivierung von AMPK mit nachfolgender Hemmung von mTOR kommt, was möglicher Weise eine Reduktion von pTau zur Folge hätte.

1.7 ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von Metformin auf neurodegenerative Prozesse in der ApoE^{-/-} Maus zu untersuchen, um daraus mögliche Therapieoptionen bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie der AD, ableiten zu können. Zunächst wurde analysiert, ob es durch Metformin zu einer Hochregulierung von FGF21 in der Peripherie und im zentralen Nervensystem kommt. Nachfolgend wurde untersucht, ob Metformin ähnlich einer Kalorienrestriktion neuroprotektiv wirkt. Diesbezüglich erfolgte eine Analyse von phosphorylierten Tau, der Neuronen- und Synapsenanzahl, sowie eine Untersuchung der Entzündung im Cortex der Mäuse anhand immunhistologischer Auswertungen nach Beendigung der experimentellen Phase. Des Weiteren erfolgte eine Analyse des Lipidmetabolismus. Es wurde untersucht, ob Metformin regulatorisch in die Lipogenese, die Lipolyse und den Lipidefflux eingreift, da eine Dyslipidämie inflammatorische Prozesse fördern und folglich zur Progredienz neurodegenerativer Prozesse beitragen kann. Die untersuchten Signalwege sind in Abb. 2 dargestellt.

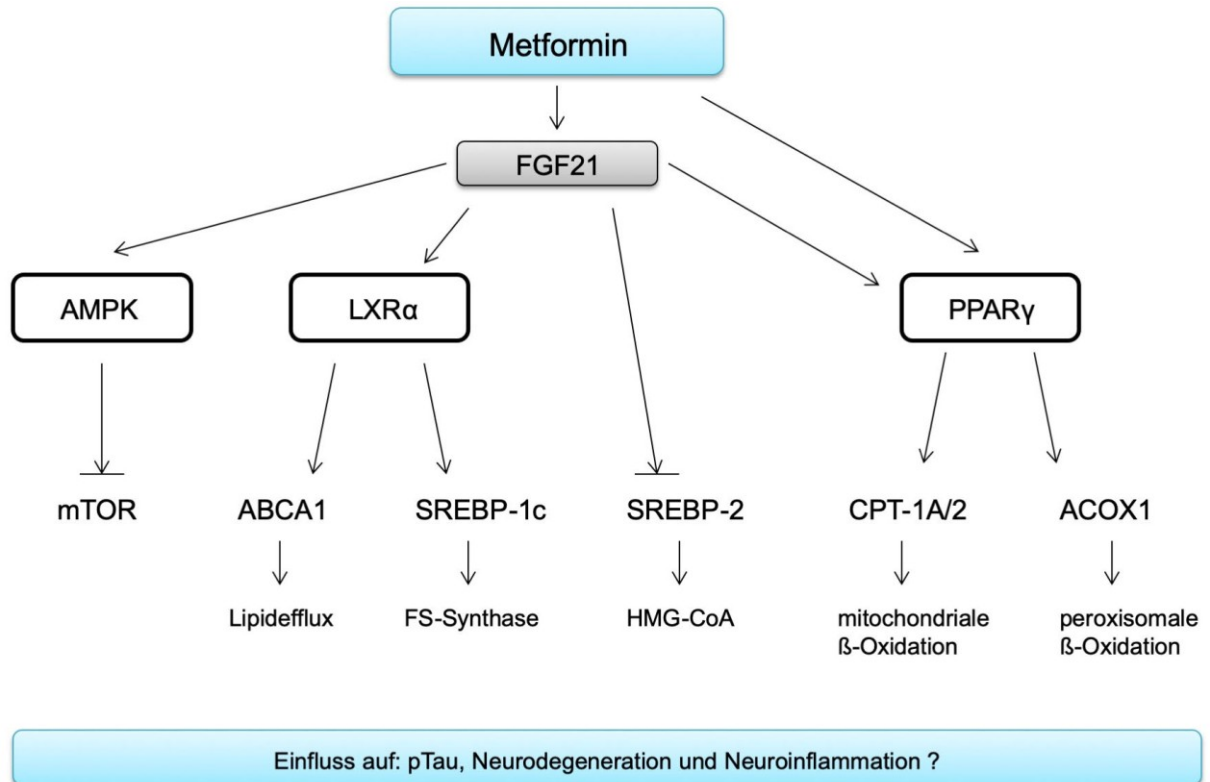


Abbildung 2: Die durch Metformin beeinflussten Signalwege. Neben des Einflusses von Metformin auf den FGF21-AMPK-mTOR Signalweges wurde auch dessen Wirkung auf den Lipidhaushalt untersucht. Des Weiteren wurde analysiert, ob es nachfolgend zu einer Reduktion, bzw. gesteigerten Neurodegeneration und -inflammation durch die Metformin-Therapie kommt. FGF21 Fibroblasten-Wachstumsfaktor 21, AMPK Adenosinmonophosphat abhängige Kinase, mTOR mechanistic Target of Rapamycin, LXRα Liver X Rezeptor α, ABCA1 ATP-binding Cassette Transporter A1, SREBP sterol regulatory element binding protein 1, FS Fettsäure, HMG-CoA 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A, PPAR Peroxisom-Proliferator-Aktivator-Rezeptor, CPT Carnitin palmitoyltransferase, ACOX Acyl-Coenzym

II. MATERIAL UND METHODE

2.1 TIERE UND TIERHALTUNG

Es wurden weibliche C57BL/6- und ApoE^{-/-} Mäuse (Charles River Wiga, Sulzfeld, Deutschland) im Alter von 10 Wochen verwendet. Die Haltung erfolgte unter spezifisch pathogenfreien nahen Bedingungen. Alle Tiere wurden einzeln im Käfig bei einer kontrollierten Raumtemperatur von ca. 22°C gehalten. Die Tiere wurden einem Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden ausgesetzt. Der Zugang zum Standardfutter und zum Trinkwasser erfolgte *ad libitum*.

2.2 VERSUCHSABLAUF

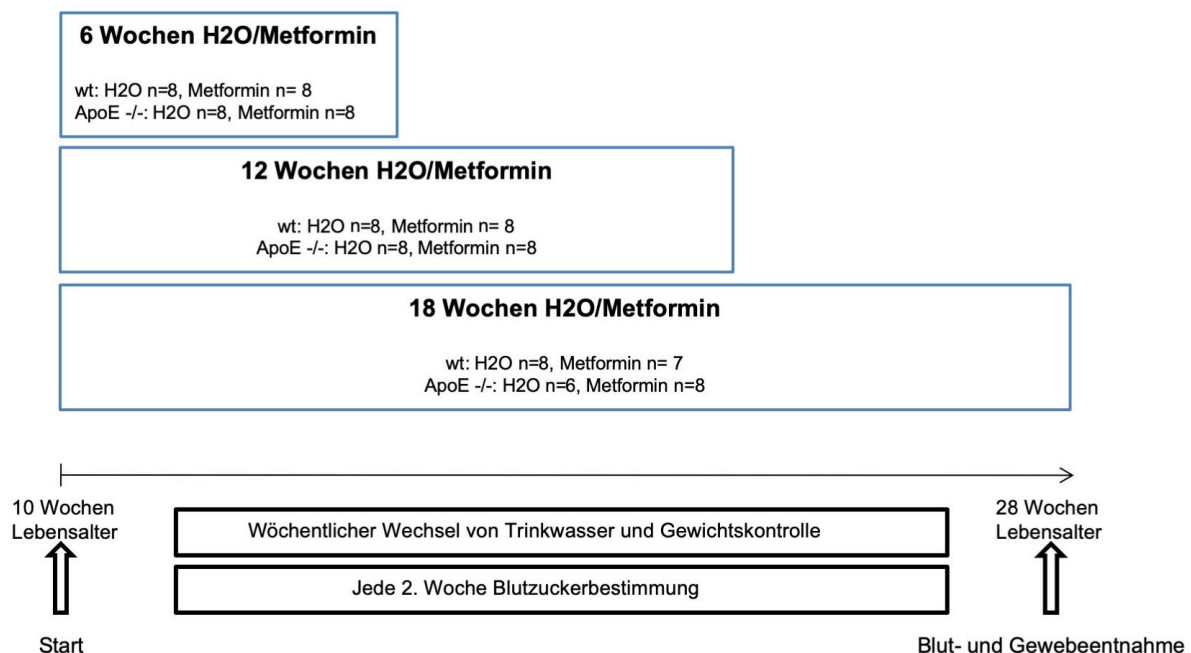


Abbildung 3: Darstellung des Versuchsablaufes.

Der zeitliche Ablauf der Experimente ist in Abb. 3 dargestellt. Es gab 3 verschiedene Therapiegruppen: 6, 12 und 18 Wochen, in denen wt (C57BL/6) und ApoE^{-/-} Mäuse in eine Kontrollgruppe (H₂O) und eine Interventionsgruppe (Metformin) eingeteilt wurden. Die Mäuse der Interventionsgruppen erhielten Metformin (1,1 Dimethylbiguanid hydrochlorid, Sigma-Aldrich Chemistry) über das Trinkwasser in einer Konzentration von ca. 300 mg/kg Körpergewicht. Der Zugang zum Trinkwasser erfolgte *ad libitum*. Die Trinkmenge wurde wöchentlich durch Wiegen der Flasche retrospektiv für die vergangene Woche ermittelt. Aus den Einzelwerten wurde eine durchschnittliche Trinkmenge für jede Versuchsgruppe

berechnet. Parallel wurde das Trinkwasser (Metforminlösung, Wasser) gewechselt und das Körpergewicht gemessen. Aus der gemittelten Trinkmenge wurde anschließend die durchschnittliche wöchentliche Metforminmenge pro Tier ermittelt. Des Weiteren erfolgte alle zwei Wochen die Messung der Spontanblutzuckerwerte aus venösem Blut aus der Schwanzvene. Nach Ablauf der jeweiligen Experimentphasen erfolgte in Narkose die Blut- und Gewebeentnahme (Gehirn).

2.3 ORGANENTNAHME

Die Blut- und Gewebeentnahme wurde in tiefer Narkose durchgeführt. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit Ketamin und Xylazin. Die Dosierung der verwendeten Medikamente wurde wie folgt vorgenommen: Ketamin 75mg/kg KG und Xylazin 6,25mg/kg Körpergewicht. Kurz nach Narkoseeinleitung wurde die Blutentnahme durchgeführt. Hierzu erfolgte die Punktion des retrobulbären venösen Plexus mit Hilfe einer Glaskapillare entlang der medialen Lidspalte. Das Blut wurde nachfolgend bei 10 000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und das gewonnene Plasma bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Nachfolgend wurde das Gehirn asserviert. Hierzu erfolgte die Dekapitation mittels Knochenschere. Es wurde die Schädelkalotten eröffnet und das Gehirn vom Hirnstamm getrennt. Eine Hemisphäre wurde in 4 % Formalin fixiert. Die andere Hemisphäre wurde mit Stickstoff kryokonserviert und bei -80 °C gelagert.

2.4 ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Mit Hilfe der enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)-Technik kann die Konzentration von Antigenen in einer Lösung bestimmt werden. Zur Bestimmung der FGF21 Konzentration im Blutplasma wurde das Quantikine® ELISA Kit (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) für Mäuse/Ratten genutzt und nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Verfahren basiert auf die Sandwich-Methode. Das Plasma (je 50µl) wurde auf eine 96-Well Platte aufgetragen, auf denen FGF21-Antikörper fixiert sind. Nach Entfernung des Überstands folgte eine Inkubation mit, für Maus-FGF21 spezifischen, Enzym-gebundenen polyklonalen Antikörper (je 100 µl). Die dabei entstehende Farbreaktion wurde nach 30 Minuten mittels einer Stop-Lösung (je 100 µl) angehalten. Bei einer Wellenlänge von 450 nm (und 520 nm Korrekturwellenlänge) erfolgte eine photometrische Absorptionsmessung der Proben mittels dem VICTOR™ X3 Light Plate Reader (PerkinElmer). Die Absorption ist proportional zur FGF21 Konzentration.

2.5 TRIGLYZERID ASSAY

Zur Analyse der Plasma-Triglyzeridkonzentration wurde das Triglyceride Colorimetric Assay-Kit (Cayman Chemical Company, Michigan, USA) verwendet. Triglyzeride werden bei diesem Messverfahren mittels Lipase in Glycerin und Fettsäuren gespalten. Durch das dabei freigesetzte Glycerin entsteht über mehrere enzymatische Reaktionen ein lila Farbstoff, der schließlich kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von 530-550 nm gemessen wird.

Der Triglyzerid Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. 10 µl der Proben wurden auf eine 96-Well Platte pipettiert. Durch das Hinzugeben von 150 µl einer Enzym Puffer Lösung wurde die enzymatische Reaktionen in Gang gesetzt. Bei Raumtemperatur wurde das Assay 15 Minuten lang auf eine Schüttelplatte inkubiert. Die kolorimetrische Messung erfolgte dann mittels dem VICTOR™ X3 Light Plate Reader (PerkinElmer) und die anschließende Auswertung wurde mit der 2030 Workstation Softwar (PerkinElmer) durchgeführt.

2.6 CHOLESTERIN ASSAY

Zur Messung des Plasma-Cholesterinspiegels wurde der EnzyChrom™ Cholesterol Assay Kit (BioAssay Sytems, Hayward, USA) verwendet. Bei dem Messverfahren entsteht durch Hydrolyse von Cholesterolester freies Cholesterin. Durch einen nachfolgenden Dehydrogenaseschritt wird NAD zu NADH oxidiert. Das entstandene NADH wird kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen und ist proportional zur Cholesterinkonzentration. Der Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Proben wurden auf 1:10 mit Assay Puffer verdünnt und je 50 µl wurden in eine 96-Well Platte pipettiert. Hinzu kamen 50 µl NAD-Lösung und 10 µl Enzymlösung. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Anschließend wurde analog zum Triglyzerid Assay die kolorimetrische Messung durchgeführt.

2.7 GENEXPRESSIONSANALYTIK

In der Genexpressionsanalytik wird die Expressionsrate eines Gens durch die Bestimmung der RNA ermittelt. Es bedarf zur Genexpressionsanalytik mehrere Schritte. Zunächst muss RNA aus dem Gewebe isoliert werden (2.7.1) und dessen Konzentration photometrisch bestimmt werden (2.7.2). Die RNA muss dann in stabile komplementäre DNA (cDNA)

umgeschrieben (2.7.3) und mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion vervielfältigt werden (2.7.4). Anschließend wird die Genexpression quantifiziert.

2.7.1 RNA-ISOLIERUNG

Als Material für die RNA-Isolierung dienten 20 mg Hirngewebe, welches mit Hilfe eines Mikro-Dismembrators homogenisiert wurde. Um die mRNA aus dem Homogenisat isolieren zu können, wurde das RNeasy® Mini Prep Kit 250 der Firma QIAGEN verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Nachdem das Gewebe homogenisiert und die Zellen lysiert wurden, konnte die freie RNA an die, in RNeasy mini Spin Säulen enthaltene, Silica Membran binden. Es folgte ein DNase Verdau mit dem RNase free DNase Kit (QIAGEN). Die isolierte RNA wurde mit Diethyldicarbonat-Wasser ($\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$) von der Säule eluiert und bei -80°C gelagert.

2.7.2 PHOTOMETRISCHE QUANTIFIZIERUNG

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung der RNA wurde das Spektralphotometer NanoDrop 2000 von ThermoFisher Scientific genutzt. Das Messverfahren basiert auf dem Prinzip des linearen Zusammenhangs zwischen Absorption und Konzentration bei einer bestimmten Wellenlänge. In diesem Fall wurde die Absorption der Nukleinsäuresuspension bei den Wellenlängen 230, 260 und 280 nm gemessen. Als Referenz diente $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$.

Mit Hilfe des Spektralphotometers kann auch eine Aussage über die Reinheit der Probe getroffen werden. Dazu wird der Absorptions-Quotient genutzt, in diesem Fall 260 nm/280 nm und 260 nm/230 nm.

2.7.3 cDNA-HERSTELLUNG

Mit dem Enzym reverse Transkriptase kann aus RNA cDNA synthetisiert werden. Dazu wurde für jede Probe ein Denaturierungsansatz (Tabelle 1) hergestellt. Oligo-Desoxythymidin, welches an den Poly-A-Schwanz der RNA bindet, diente als Primer für die reverse Transkriptase. Die Proben wurden mit einem Thermocycler bei 72°C für 10 Minuten denaturiert. Ein Mastermix (Tabelle 2), das unter anderem die reverse Transkriptase enthält, wurde hinzugefügt. Die eigentliche cDNA Synthese erfolgte dann beim Thermocyclerprogramm RT42. Dabei findet im ersten Schritt 60 Minuten lang bei 42°C eine Denaturierung statt, gefolgt von der cDNA Synthese bei 95°C für 5 Minuten und

abschließender Kühlung auf 4 °C. Die Proben wurden anschließend mit H₂O_{DEPC} 1:2 verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Denaturierungsansatzes

Substanzen	Mengen
RNA	2 µg
H ₂ O _{DEPC}	11 µl
Oligo(dT) ₁₈ -Primer	1 µl

Tabelle 2: Zusammensetzung des RT-Mastermixes

Substanzen	Mengen
5x First Strand Puffer	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
10 mM dNTP	1 µl
SuperScript™ II Reverse Transkriptase	1 µl

2.7.4 REAL-TIME QUANTITATIVE POLYMERASE-KETTENREAKTION (RT-qPCR)

Die vorhandenen Nukleinsäuren wurden in diesem Schritt mit dem Kit Lightcycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) vervielfältigt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Zur Detektion der doppelsträngigen DNA diente der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, der proportional zum PCR-Produkt zunahm. Es erfolgte die Ansetzung eines Primermixes, der aus 80 µl PCR-Wasser, 10 µl Forward - und 10 µl Reverse Primer, entsprechend dem zu untersuchenden Gen, bestand (Tabelle 3). Die Primer ermöglichen es, einen bestimmten DNA-Bereich zu amplifizieren. Mit den Primermix wurde anschließend ein Mastermix hergestellt (Tabelle 4). In jedes Well wurden 19 µl Mastermix und 1 µl der cDNA-Probe pipettiert. Als Positivkontrolle diente cDNA von C57BL/6-Maus-Genpool und als Negativkontrolle Aqua dest. Mit Hilfe des iCycler iQTM5 Lightcycler von Bio-Rad wurde die Analyse durchgeführt (Tabelle 5).

Tabelle 3: Primerpaare für die RT-qPCR, fwd = Forward Primer, rev = Reverse Primer

Transkript	Orientierung	Sequenz 5'→3'
<i>abca1</i>	fwd rev	ACTGGAGACACCCCTGTGAC GGAGAGCTTTCGTTTGTTGC
<i>acox1</i>	fwd rev	GAGCTGCTCACAGTGA CTG ACTGCAGGGGCTTCAAGTG
<i>cpt-1a</i>	fwd rev	CCAGACTCCTCAGCAGCAG GGCTTGTCTCAAGTGCTCC
<i>cpt-2</i>	fwd rev	GGCTGAGTGCTCCAAATACC CTGGTGGACAGGATGTTGTG
<i>fas</i>	fwd rev	TACCATGGCAACGTGACACT TAGCCCTCCCGTACACTCAC
<i>HMG-CoA Reduktase</i>	fwd rev	CAGGATGCAGCACAGAATGT CTTTGCATGCTCCTTGAACA
<i>Ixra</i>	fwd rev	TGCCATCAGCATCTTCTCTG GGCTCACCAGCTTCATTAGC
<i>ppary</i>	fwd rev	TCATGACCAGGGAGTTCCTC CAGGTTGTCTTGGATGTCCTC
<i>srebp-1c</i>	fwd rev	GTACCTGCGGGACAGCTTAG CAGGTCATGTTGGAAACCAC
<i>srebp-2</i>	fwd rev	ACCTGTGACCTGCTACTGTC CAGCTGGTGTGTACGGGTAG
<i>rps-18</i>	fwd rev	AGGATGTGAAGGATGGGAAG TTGGATACACCCACAGTTGC

Tabelle 4: Zusammensetzung RT-qPCR Mastermix

Substanzen	Mengen
Primermix	1 µl
PCR-Wasser	14 µl
SYBR Green	4 µl

Tabelle 5: Lightcyclerprogramm, Zyklus 2 bis 4 wurden 40x wiederholt

Zyklus	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1. Initiale Denaturierung	95	10
2. Primerhybridisierung	55	5
3. Elongation	65	0,25
4. Denaturierung	95	0,25
5. Kühlung	4	∞

2.7.5 RELATIVE QUANTIFIZIERUNG DER GENEXPRESSION

Zur relativen Quantifizierung der Genexpressionen wurde die $\Delta\Delta Ct$ Methode genutzt. Der Ct-Wert kennzeichnet den PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz die Hintergrundstrahlung signifikant überschreitet. Somit erhält man für jedes Gen einen Ct-Wert. Von diesen Zielgen-Ct-Werten wird jeweils der RPS13-Ct-Wert, welches als Referenzgen diente, subtrahiert. Das Ergebnis entspricht ΔCt . Nachfolgend wurde der ΔCt -Wert der Positivkontrolle vom ΔCt -Wert des Zielgens subtrahiert und man erhielt $\Delta\Delta Ct$. Mit dem $\Delta\Delta Ct$ wurde anschließend die Ratio bestimmt ($\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$).

2.8 PROTEINANALYTIK

Um Informationen über den möglichen Signalweg von FGF21 zu gewinnen, wurde eine Proteinanalyse der Zielproteine AMPK und Tau, im phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem Zustand, durchgeführt.

Zur Analyse erfolgte zunächst die Isolierung der Zielproteine aus dem Gewebe (2.8.1). Die Konzentration dieser Proteine wurde nachfolgend bestimmt (2.8.2) und es erfolgte eine Auftrennung entsprechend ihres Molekulargewichtes mittels Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (2.8.3). Durch einen Semi-Dry-Western-Blot wurden die Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran übertragen (2.8.4). Mit Hilfe von Antikörpern erfolgte eine Immundetektion und zuletzt eine densitometrische Quantifizierung (2.8.5).

2.8.1 PROTEINISOLIERUNG

Die Proteine wurden aus 30 mg Gehirngewebe isoliert. Zunächst wurde das Gewebe mittels Dismembrator zerkleinert, anschließend wurde der Probe Lysepuffer (Tabelle 6) und PhosSTOP™ (Roche) hinzugefügt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dabei wurde das Lysat, durch mehrmaliges Durchmischen auf einem Vortexmischer, homogen gehalten. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (10000 x g, 10 Minuten, 4 °C) und der Überstand abpipettiert.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Lysepuffers

Substanzen	Mengen
Aqua dest.	9,026 ml
1 M TRIS pH 7,5	100 µl
5 M NaCl	20 µl
250 mM EDTA	4 µl
10% Triton x-100	500 µl
4% NaN ₃	50 µl
100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid	200 µl
Protease Inhibitor Cocktail	100 µl

2.8.2 PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels bovinen Serumalbumin (BSA) Assay. Dabei werden an Peptidbindungen gebundene Cu²⁺-Ionen bei alkalischem pH-Wert zu Cu⁺-Ionen reduziert. Diese reagieren dann mit Bicinchoninsäure-Molekülen und bilden einen violetten Farbstoffkomplex, der anschließend photometrisch nachgewiesen werden kann.

Zunächst wurde eine Standard-Verdünnungsreihe mit BSA angesetzt, mit der eine nötige Standardkurve ermittelt wurde. Das BCA-Reagenz bestand zu 50 Volumenanteilen aus BCA™ Protein Assay Reagenz A und zu einem Anteil aus Reagenz B (Sigma-Alrich Chemie GmbH, Deutschland). Die zu untersuchenden Proben wurden auf eine 96-Well Platte aufgetragen und jeweils mit 100 µl des BCA-Reagenz versetzt. Bei 37°C erfolgte eine 30-minütige Schüttelinkubation. Anschließend konnte die Absorption bei 562 nm gemessen werden. Es erfolgte eine Dreifachbestimmung und die Auswertung der erhobenen Werte mit Hilfe der Software Magellan™ 3.

2.8.3 SDS-PAGE

SDS-PAGE ist eine analytische Methode zur Auftrennung von Proteingemischen im elektrisches Feld. Das sodium dodecyl sulfat (SDS) sorgt dafür, dass alle Proteine eine konstante negative Ladungsverteilung besitzen. Als Trennmedium dient ein Gel aus Polyacrylamid, welches wie ein Sieb wirkt und die im elektrischen Feld wandernden Proteine nach ihrem Molekulargewicht sortiert. Bei der Analyse des Proteingemisches wurde sowohl ein weitporiges Sammelgel, als auch ein engporiges Trenngel, angepasst an das Molekulargewicht der Zielproteine, genutzt. Mit Hilfe des Mini-Protean®3 CELL-Systems (Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland) wurden die SDS-Gele gegossen (Tabelle 7). Zunächst wurde das Trenngel angefertigt und mit 100 % Isopropanol überschichtet, bis das Gel auspolymerisiert war. Das Isopropanol wurde dann entfernt und durch das Sammelgel ersetzt. Nachdem auch die Polymerisation des Sammelgels abgeschlossen war, konnte das fertige SDS-Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit Elektrophoresepuffer (Tabelle 8) befüllt werden. Die Proben mit einer Konzentration von 40 µg/µl wurden mit Probenpuffer (Tabelle 9) versetzt und zentrifugiert. Nachfolgend wurden die Proben 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend auf Eis gelagert. Die Probenansätze konnten nun zusammen mit dem Marker peqGOLD in die Taschen des SDS-Gels pipettiert werden. Zunächst erfolgt eine Auftrennung der Probe innerhalb des Sammelgels bei einer Stromstärke von 10 mA, gefolgt von einer Sortierung innerhalb des Trenngels bei 20 mA.

Tabelle 7: Zusammensetzung SDS-Gel

Substanzen	Trenngel			Sammelgel
	8%	10%	12%	5%
Aqua dest.	1,675 ml	1,375 ml	1,025 ml	1,375 ml
TRIS pH 8,8	1,875 ml	1,875 ml	1,875 ml	-
TRIS pH 6,8	-	-	-	1,875 ml
Acrylamid	1,350 ml	1,650 ml	2 ml	0,25 µl
10% SDS	50 µl	50 µl	50 µl	12,5 µl
10% Ammoniumpersulfat	50 µl	50 µl	50 µl	12,5 µl
Tetramethylethyldiamin	5 µl	5 µl	5 µl	1,25 µl

Tabelle 8: Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers

Substanzen	Mengen
Aqua dest.	1000 ml
TRIS	30,3 g
Glycin	144 g
SDS	10 g

Tabelle 9: Zusammensetzung des Probenpuffers (2x)

Substanzen	Mengen
Aqua dest.	20 ml
1 M TRIS 6,6	2,5 ml
SDS	0,8 g
87% Glycerin	4,56 g
DTT	154,2 mg
Bromphenolblau	0,2 ml

2.8.4 SEMI-DRY-WESTERN-BLOT

Die beim SDS-PAGE entstandenen Proteinbanden werden im nächsten Schritt auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Trägermembran transferiert. Die Übertragung erfolgt mittels Elektrophorese. Die negativ geladenen Proteine wandern dabei in Richtung der Anode. Bei der Semi-Dry Methode werden die Blotting-Papiere mit Pufferlösung gesättigt.

Zunächst wurden die erforderlichen Pufferlösungen (Tabelle 10) angesetzt, in denen nachfolgend die Filterpapierstreifen getränkt wurden. Es erfolgte die Aktivierung der PVDF-Membran mittels 100 % Methanol 15 Sekunden lang, anschließend wurde die Membran für 2 Minuten in Aqua dest. getaucht und schließlich für weitere 5 Minuten im Anodenpuffer II äquilibriert. Der Blot wurde dann wie folgt zusammengesetzt:

Kathode

3 Filterpapiere gesättigt mit Kathodenpuffer

SDS-Polyacrylamidgel

PVDF Membran

1 Filterpapier gesättigt mit Anodenpuffer II

2 Filterpapiere gesättigt mit Anodenpuffer I

Anode

Auf die mit dem Anodenpuffer I (2x) und Anodenpuffer II (1x) getränkten Filterpapieren wurde die PVDF-Membran platziert, gefolgt vom SDS-Gel. Abschließend wurden die mit Kathodenpuffer gesättigten Filterpapiere (3x) aufgelegt und eine Stromstärke von 275 mA angelegt. Nach einer Stunde war der Transfer abgeschlossen und die Membran konnte gründlich in TRIS-buffered saline with Tween20 (TBST, Tabelle 11 und 12) gewaschen werden. Unspezifische Bindungsstellen wurden 30 Minuten bei 37 °C mit BSA geblockt.

Tabelle 10: Zusammensetzung der Transferpuffer

Substanzen	Mengen		
	Anodenpuffer I pH 10,4	Anodenpuffer II pH 10,4	Kathodenpuffer pH 9,4
Aqua dest.	1000 ml	1000 ml	1000 ml
Glycin	-	-	3,004 g
TRIS	36,342 g	3,028 g	3,028 g
Methanol	200 ml	200 ml	200 ml

Tabelle 11: Zusammensetzung TBS

Substanzen	Mengen
Aqua dest.	1000 ml
TRIS	2,42 g
NaCl	8 g

Tabelle 12: Zusammensetzung TBST

Substanzen	Mengen
Aqua dest.	900 ml
10 x TBS	100 ml
Tween20®	1 g

2.8.5 IMMUNDETEKTION

Zur Identifizierung der Proteine wurde die Membran mit in BSA gelösten Antikörper (Tabelle 13) über 12 Stunden bei 4 °C, auf einer Schüttelplatte inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran in mehreren Zyklen, jeweils 5 Minuten gewaschen, zunächst dreimal mit TBST, nachfolgend dreimal mit TBS. Im nächster Arbeitsschritt wurde die Membran für 1 Stunde mit Sekundärantikörpern (Tabelle 14) inkubiert. Dies erfolgte ebenfalls unter stetigem Schütteln. Es folgten weitere Waschzyklen mit TBS und TBST. Anschließend wurde die Membran für 5 Minuten in eine Detektionslösung getaucht. Mit Hilfe des Gel-Readers konnte dann die Chemilumineszenz gemessen werden. Die Auswertung erfolgte mit dem ChemicDoc™-XRS-System (Bio-Rad Laboratories).

Die Durchführung einer zweiten Immundetektion ermöglichte die Verifizierung der geladenen Proteinmenge. Dazu wurden die Antikörper mit Hilfe einer Strip-Lösung (Tabelle 15), erst für 15 Minuten bei 37 °C, dann weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur, entfernt. Nach weiteren Waschzyklen mit TBS und TBST wurde der Vorgang wie bei der ersten Immundetektion wiederholt.

Die Auswertung der zuvor erhaltenen Ergebnisse erfolgte mit der Quantity One® 4.6.6 Software. Hierbei wurde die relative Proteinexpression bestimmt.

Tabelle 13: Primärantikörper (Cell Signaling®)

Antikörper	Host	Klonalität	Molekulargewicht	Verdünnung
Anit-pAMPK	Hase	monoklonal	62 kDa	1:1000
Anti-AMPK	Hase	polyklonal	62 kDa	1:1000
Anti-pTau	Maus	monoklonal	50-80 kDa	1:1000
Anti-Tau	Maus	monoklonal	50-80 kDa	1:1000

Tabelle 14: Sekundärantikörper (Cell Signaling®)

Antikörper	Host	Target	Konjugat	Verdünnung
Anti-rabbit-IgG-HRP-linked	Pferd	pAMPK	HRP	1:10.000
Anti-rabbit-IgG-HRP-linked	Pferd	AMPK	HRP	1:10.000
Anti-mouse-IgG-HRP-linked	Pferd	pTau	HRP	1:10.000
Anti-mouse-IgG-HRP-linked	Pferd	Tau	HRP	1:10.000

Tabelle 15: Zusammensetzung der Strip-Lösung

Substanzen	Mengen
Aqua dest.	500 ml
1% SDS	0,5 g
25 mM Glycin	0,938 g

2.9 IMMUNHISTOLOGIE

Das Gehirn der Mäuse wurde immunhistologisch aufgearbeitet, um unterschiedliche Zielproteine zu identifizieren und darzustellen. Nach Organentnahme wurde das Gehirn für 6 Wochen in 4 % Formalinlösung fixiert. Anschließend erfolgte die Einbettung in Paraffin. Mit einem Mikrotom wurden 4 µm dünne Schnitte angefertigt und auf Flex IHC Microscope Slides (Aligent Dako, Santa Clara, USA) aufgezogen. Es folgte eine Inkubation mit Antikörpern der Zielproteine (Tabelle 16). Um diese nachfolgend sichtbar zu machen, wurde das DAB chromogen Universal LSAB® kit (Dako®) genutzt und die Schnitte mit Hämalaun gefärbt. Eine Betrachtung der Schnitte erfolgte am Olympus®BX51-Mikroskop. Die Anzahl der überprüften Gesichtsfelder variierte stark in Abhängigkeit von der Qualität der immunhistologischen Präparate. Im Durchschnitt wurden 12 Gesichtsfelder pro Tier gezählt. Histologische Bilder wurden mit Hilfe der Color View II Kamera (Soft Imaging System GmbH, München, Deutschland) erstellt.

Tabelle 16: Antikörper der immunhistologischen Auswertung

Antikörper	Host	Klonalität	Verdünnung
Anti-pFGFR1c (Cell Signaling®)	Hase	polyklonal	1:100
Anti-pmTOR (Cell Signaling®)	Hase	monoklonal	1:100
Anti-PSD95 (Abcam®)	Hase	polyklonal	1:1000
Anti-GFAP (Abcam®)	Hase	polyklonal	1:100
Anti-NeuN (Abcam®)	Hase	polyklonal	1:1000

2.10 STATISTIK

Die statistische Auswertung sowie die graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe SigmaPlot® Version 13 (Jandel Scientific, San Rafael, USA). Die Datensätze wurden zunächst auf Normalverteilung geprüft und anschließend die Mittelwerte und die standard errors of mean (SEM) berechnet. Ein Vergleich der Versuchsgruppe erfolgte entweder durch den Two-Way-beziehungsweise One-Way-ANOVA-Test oder mittels t-Test. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant definiert.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

III. ERGEBNISSE

3.1 TRINKMENGE

Anhand der durchschnittlichen wöchentlichen Trinkmenge wurde die aufgenommene Metformindosis retrospektiv für die vergangene Woche berechnet. Da es von Bedeutung war, ob beide Mausstämme die gleichen Trinkmengen und nachfolgend die gleichen Metforminmengen zu sich nahmen, erfolgten hier statistische Vergleiche der Trinkmenge zwischen den Mausstämmen.

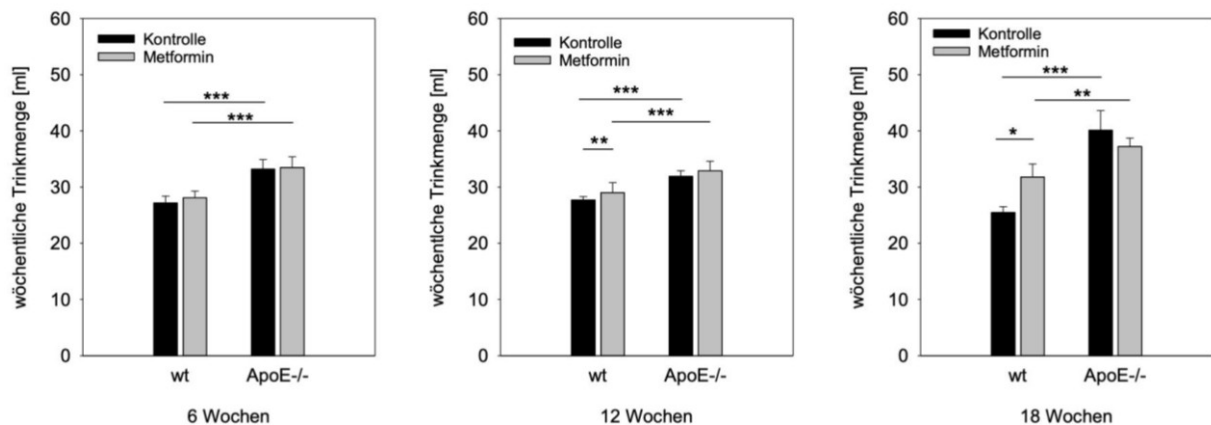


Abbildung 4: ApoE-/- Tieren tranken signifikant mehr als der Wildtyp. Durchschnittliche wöchentliche Trinkmenge aller Therapiegruppen. Gruppengrößen: 6 Wochen jeweils n=8, 12 Wochen jeweils n=8, 18 Wochen Wildtyp-Kontrolle n= 8. Wildtyp-Metformin n= 7, ApoE-/- Kontrolle n=6, ApoE-/- Metformin n=8. MW \pm SEM, One Way ANOVA gefolgt vom Holm Sidak Test: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001

In der 6 Wochen Therapiegruppe hatte die Wildtyp-Mäuse im Mittel 27-28 ml Trinkwasser pro Woche pro Tier zu sich genommen. Eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant höhere Trinkmenge nahmen die ApoE-/- Mäuse mit durchschnittlich 33 ml zu sich. Metformin zeigte hier keinen Einfluss auf das Trinkverhalten der Mäuse beider Mausstämme.

Mit zunehmender Therapielänge haben die Wildtyp-Mäuse, welche Metformin erhielten, signifikant mehr Trinkwasser zu sich genommen als die Tiere der Wildtyp-Kontrollgruppe (H₂O). Bei den ApoE-/- Mäusen gab es weder bei 12 Wochen, noch bei 18 Wochen Therapielänge einen Unterschied der Trinkmenge zwischen der Kontroll-(H₂O) und der Interventionsgruppe (Metformin). Analog zur 6 Wochen Therapiegruppe gab es auch in diesen Therapiegruppen (12 und 18 Wochen) einen signifikanten Unterschied der Trinkmenge, wenn man beide Mausstämme mit einander verglich.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die ApoE-/- Mäuse signifikant mehr Trinkwasser zu sich nahmen als die Wildtyp-Mäuse.

3.2 METFORMINDOSIS

Aus der durchschnittlichen wöchentlichen Trinkmenge wurde die mittlere Tagesdosis Metformin jedes einzelnen Tieres ermittelt. Aus den Einzelwerten wurde der Mittelwert für jede Versuchsgruppe errechnet, um diese dann gruppenweise zu vergleichen.

Tabelle 17: Rechnerisch ermittelte mittlere Tagesdosis der jeweiligen Versuchsgruppen. Mittelwerte \pm SEM, T-Test:** $p < 0,01$ im Vergleich zum Wildtyp

	Mittlere Tagesdosis in mg/kg KG
6 Wochen	
wt	267,0 \pm 13,4
ApoE-/-	299,5 \pm 11,8
12 Wochen	
wt	253,0 \pm 13,5
ApoE-/-	265,8 \pm 12,9
18 Wochen	
wt	244,1 \pm 11,1
ApoE-/-	291,3 \pm 10,5**

Wie in 3.1 aufgeführt, haben die ApoE-/- Mäuse signifikant mehr Trinkwasser zu sich genommen. Dementsprechend haben die ApoE-/- Mäuse auch eine höhere Menge an Metformin aufgenommen. Bei einer Therapielänge von 18 Wochen zeigte sich sogar ein signifikanter Unterschied in der mittleren Tagesdosis beim Vergleich der ApoE-/- Maus mit dem Wildtyp. Aufgrund dieser unterschiedlichen Tagesdosis an Metformin zwischen der ApoE-/- Maus und dem Wildtyp werden im folgenden alle Ergebnisse getrennt dargestellt.

3.3 KÖRPERGEWICHT

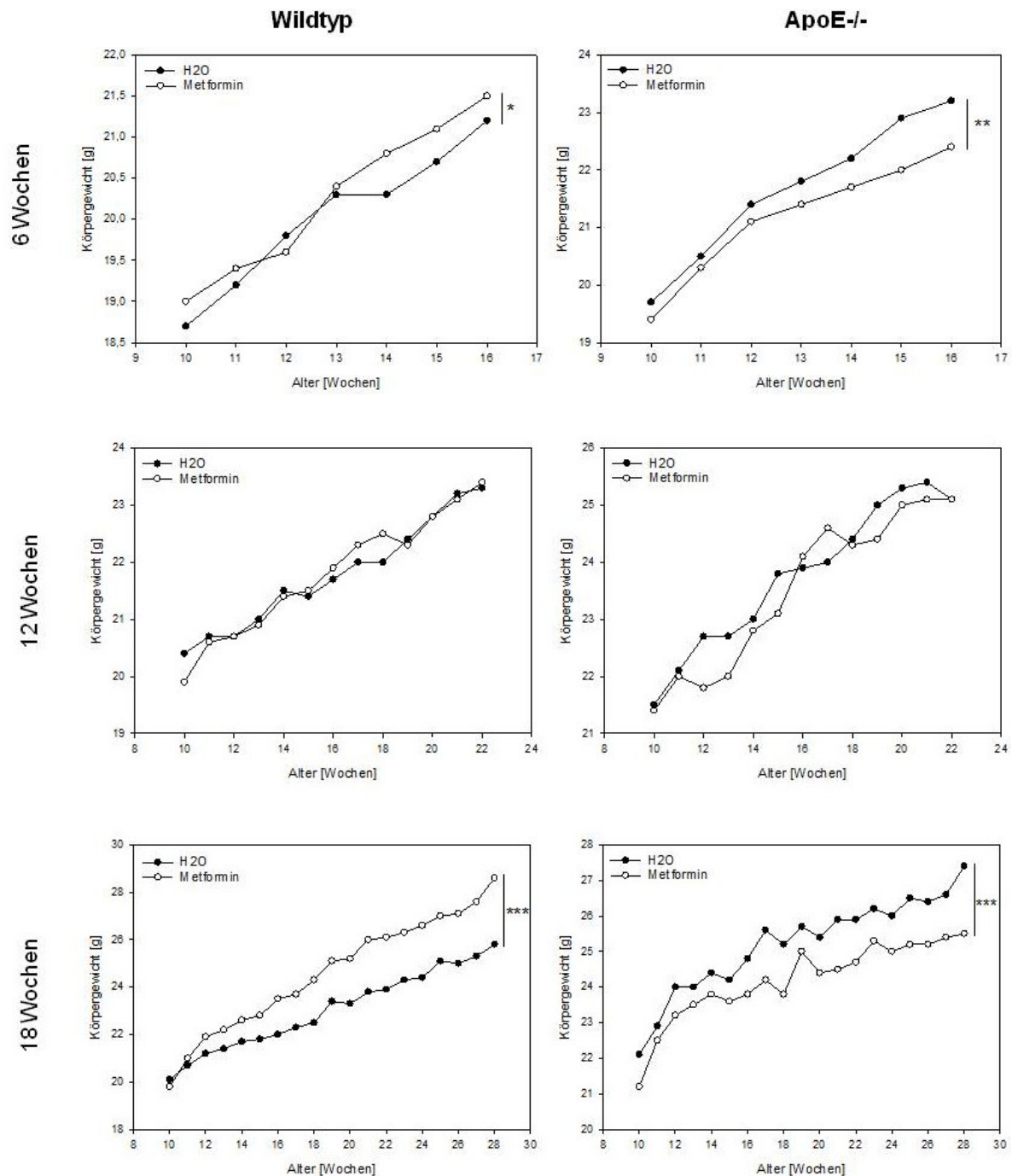


Abbildung 5: Durchschnittliches Körpergewicht der Versuchstiere in der 6, 12 und 18 Wochen Therapiegruppe. 6 Wochen jeweils n=8, 12 Wochen jeweils n=8, 18 Wochen: Wildtyp-Kontrollgruppe n=8, Wildtyp-Interventionsgruppe n=7, ApoE-/- Kontrollgruppe n=6, ApoE-/- Interventionsgruppe n=8. MW, Two-Way-ANOVA * p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Die wöchentliche Gewichtskontrolle zeigte bei den Wildtyp-Mäusen, welche 6 Wochen mit Wasser bzw. Metformin behandelt wurden, eine relative Gewichtszunahme von bis zu 13,4 %. Dabei wurde das Gewicht zu Beginn der Therapie (10 Wochen) mit dem am

Therapieende (16 Wochen) miteinander verglichen. Die Gewichtszunahme der Wildtyp-Interventionsgruppe (Metformin) über die 6 Wochen war mit $P=0,038$ signifikant höher im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe (H_2O). Die ApoE-/- Mäuse zeigten nach 6 Wochen eine relative Gewichtszunahme von 18,3 % (H_2O) bzw. 15,5 % (Metformin). Auch hier kam es in der Kontrollgruppe (H_2O) innerhalb der 6 Wochen zu einer signifikant ($P=0,003$) höheren Gewichtszunahme im Vergleich zur Interventionsgruppe (Metformin).

In der 12 Wochen Therapiegruppe haben die Mäuse beider Stämme regelrecht an Gewicht über die Zeit zugenommen, unabhängig davon ob die Tieren Wasser oder Metformin erhielten. Beim Wildtyp sah man nach 12 Wochen eine relative Gewichtszunahme von bis zu 18 %. Bei der ApoE-/- Maus kam es im Mittel zu einer Gewichtszunahme von bis zu 17 %.

In der 18 Wochen Therapiegruppe ergab die Gewichtskontrolle der Wildtyp-Mäuse eine relative Gewichtszunahme von 28 % (H_2O) bzw. 44 % (Metformin). Analog zur 6 Wochen Therapiegruppe zeigte die Wildtyp-Interventionsgruppe, die Metformin erhielt, im Verlauf einen signifikant ($P<0,001$) höhere Gewichtszunahme als die Kontrollgruppe. Bei den ApoE-/- Mäuse verhielt es sich vice versa. Die Gewichtszunahme der ApoE-/- Kontrollgruppe (H_2O) war mit $P<0,001$ signifikant höher als die Gewichtszunahme in der ApoE-/- Interventionsgruppe (Metformin). Die ApoE-/- Maus zeigte eine relative Gewichtszunahme von 24,0 % (H_2O) bzw. 19 % (Metformin).

Zusammenfassend führte Metformin beim Wildtyp im Verlauf des Experimentes zu einer erhöhten Gewichtszunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei der ApoE-/- Maus zeigte Metformin dagegen eine gewichtsreduzierende Wirkung.

3.4 BLUTZUCKER

Alle zwei Wochen wurde ein spontaner Blutzuckerwert gemessen. Ziel war es, einen Überblick über die mittleren Blutzuckerwerte gruppenweise zu gewinnen und den Einfluss von Metformin auf den Blutzucker zu untersuchen.

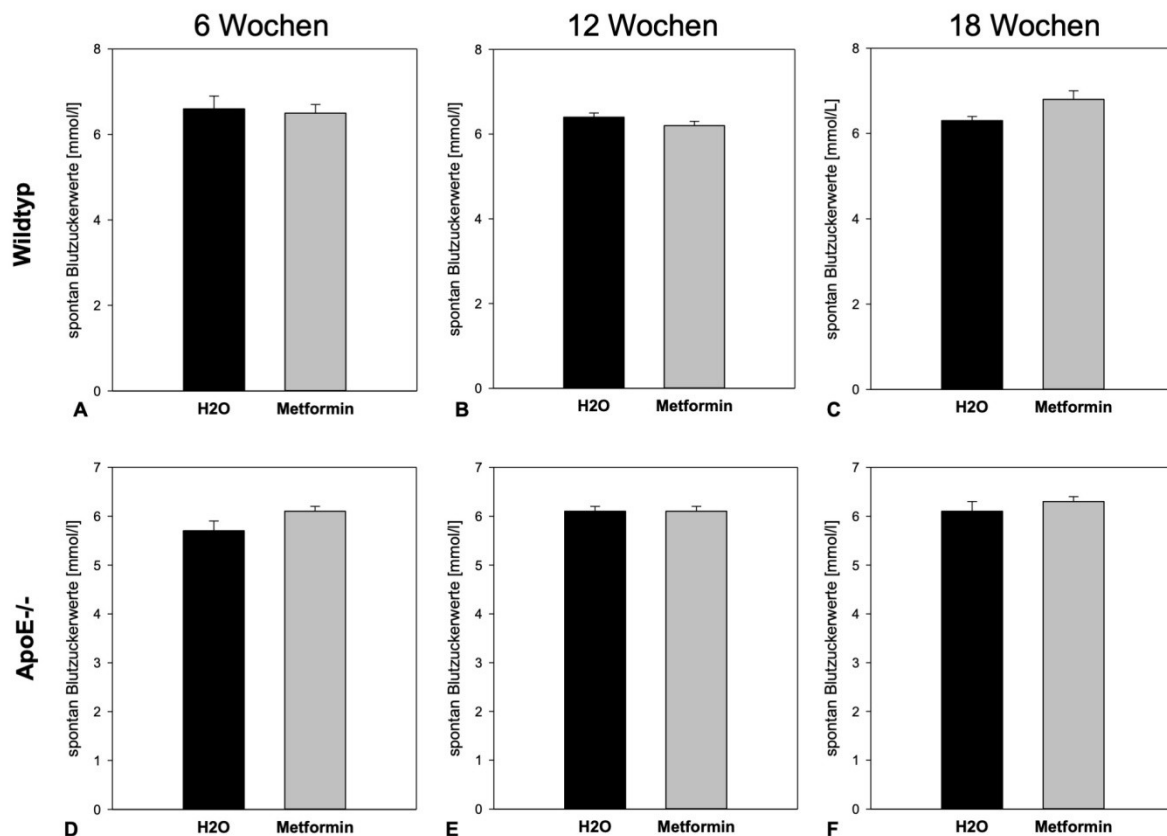


Abbildung 6: Metformin zeigte keinen Einfluss auf die spontanen Blutzuckerwerte. Gemittelte spontane Blutzuckerwerte aller Versuchsgruppen. Gruppengrößen: 6 Wochen jeweils n=8, 12 Wochen jeweils n=8, 18 Wochen Wildtyp-Kontrolle n= 8. Wildtyp-Metformin n= 7, ApoE-/- Kontrolle n=6, ApoE-/- Metformin n=8. Mittelwerte \pm SEM, t-Test: keine statistisch signifikanten Unterschiede.

In den 3 Therapiegruppen zeigten sich im Mittel sowohl beim Wildtyp als auch bei der ApoE-/- Maus Blutzuckerwerte um 6 mmol/l. Dabei handelt es sich um physiologische Blutzuckerwerte, welche durch Metformin nicht beeinflusst wurden.

3.5 FGF21 KONZENTRATIONEN IM BLUTPLASMA

Mittels ELISA wurde die FGF21-Konzentration im Blutplasma, welches am Ende des jeweiligen Experiments gewonnen wurde, bestimmt. Ziel war es zu untersuchen, ob es durch die Gabe von Metformin zu einer Erhöhung der FGF21 Plasmakonzentration kam.

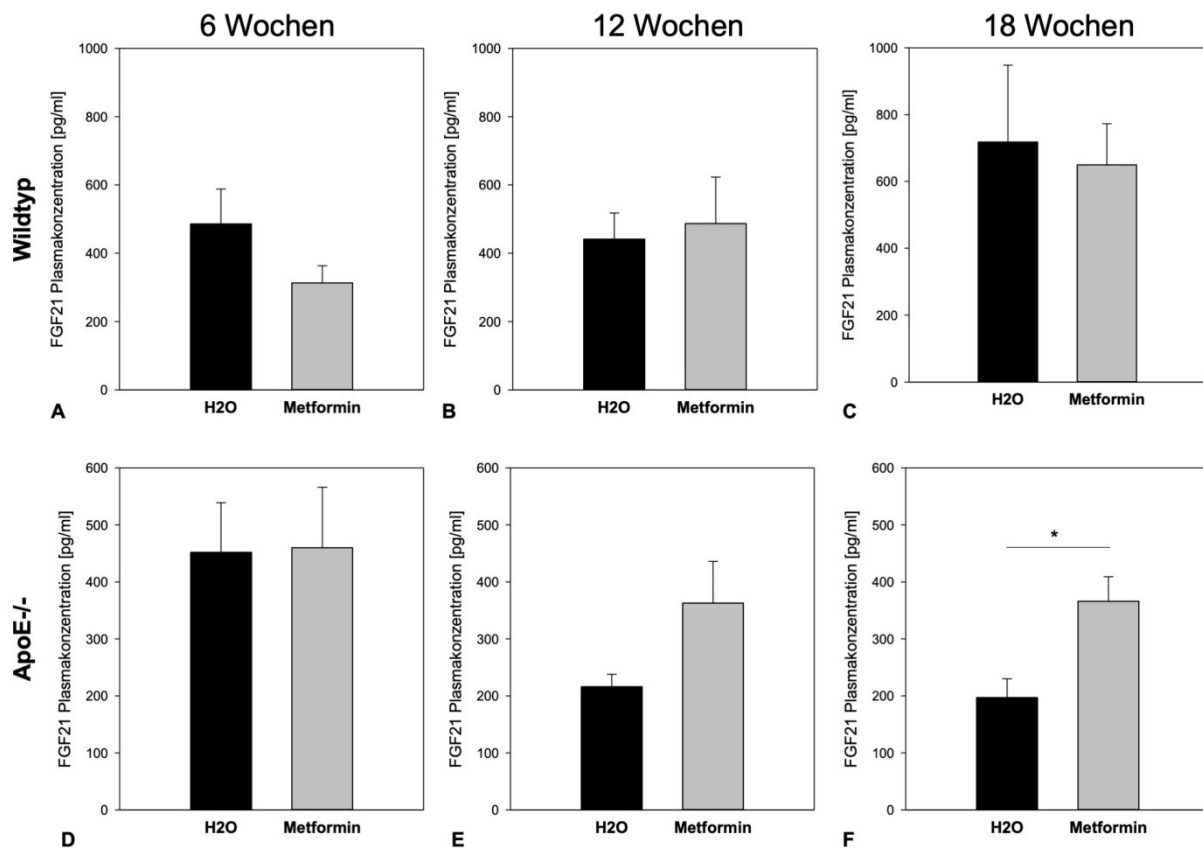


Abbildung 7: Metformin zeigt einen signifikanten Einfluss auf die FGF21 Plasmakonzentration in der ApoE^{-/-} Maus. Dargestellt ist die FGF21 Plasmakonzentration der jeweiligen Versuchsgruppen. 6 Wochen: A) Wildtyp-Kontrolle n=8, Wildtyp-Metformin n=6, D) ApoE^{-/-} Kontrolle n=8, ApoE^{-/-} Metformin n=8. 12 Wochen: B) Wildtyp-Kontrolle n=8, Wildtyp-Metformin n=7, E) ApoE^{-/-} Kontrolle n=8, ApoE^{-/-} Metformin n=7. 18 Wochen: C) Wildtyp-Kontrolle n=6, Wildtyp-Metformin n=7, F) ApoE^{-/-} Kontrolle n=6, ApoE^{-/-} Metformin n=8. Darstellung: Mittelwert ± SEM. t-Test: *p<0,05.

Metformin zeigte beim Wildtyp keinen Einfluss auf die FGF21 Plasmakonzentration, weder nach 6, nach 12, noch nach 18 Wochen (Abb. 7 A-C). Bei der ApoE^{-/-} Maus kam es mit zunehmender Versuchslänge und Alter zu einer Reduktion der FGF21 Plasmakonzentration. Nach der Einnahme von Metformin über 6 Wochen zeigte sich noch keine Veränderung in der FGF21 Plasmakonzentration bei der ApoE^{-/-} Maus. Nach 12 Wochen konnte bereits ein tendenzieller Anstieg von FGF21 in der mit Metformin behandelten ApoE^{-/-} Maus verzeichnet werden. Ein signifikanter Anstieg (P=0,013) der FGF21 Plasmakonzentration konnte letztlich nach einer Therapielänge von 18 Wochen und in einem Alter von 7 Monaten beobachtet werden. In der ApoE^{-/-} Maus lag der Durchschnittswert nach 18 Wochen bei 197 pg/ml (H₂O), bzw. bei 366 pg/ml (Metformin). Die FGF21 Plasmakonzentration betrug somit in der ApoE^{-/-} Interventionsgruppe (Metformin) nach einer Therapielänge von 18 Wochen das 1,86 fache im Vergleich zur ApoE^{-/-} Kontrollgruppe (H₂O).

Zusammenfassend zeigte die ApoE^{-/-} Maus eine mit dem Alter sinkende FGF21 Plasmakonzentration, welche durch eine langfristige Einnahme von Metformin über 18 Wochen wieder einen Anstieg verzeichnete.

3.6 FGF21-pAMPK-mTOR SIGNALWEG (IM 18 WOCHEN EXPERIMENT)

Da erst die Einnahme von Metformin über 18 Wochen zu einem signifikanten Anstieg der FGF21 Plasmakonzentration in der ApoE^{-/-} Maus führte, erfolgten die nachfolgenden Untersuchungen nur an den Versuchsgruppen aus dem 18 Wochen Experiment.

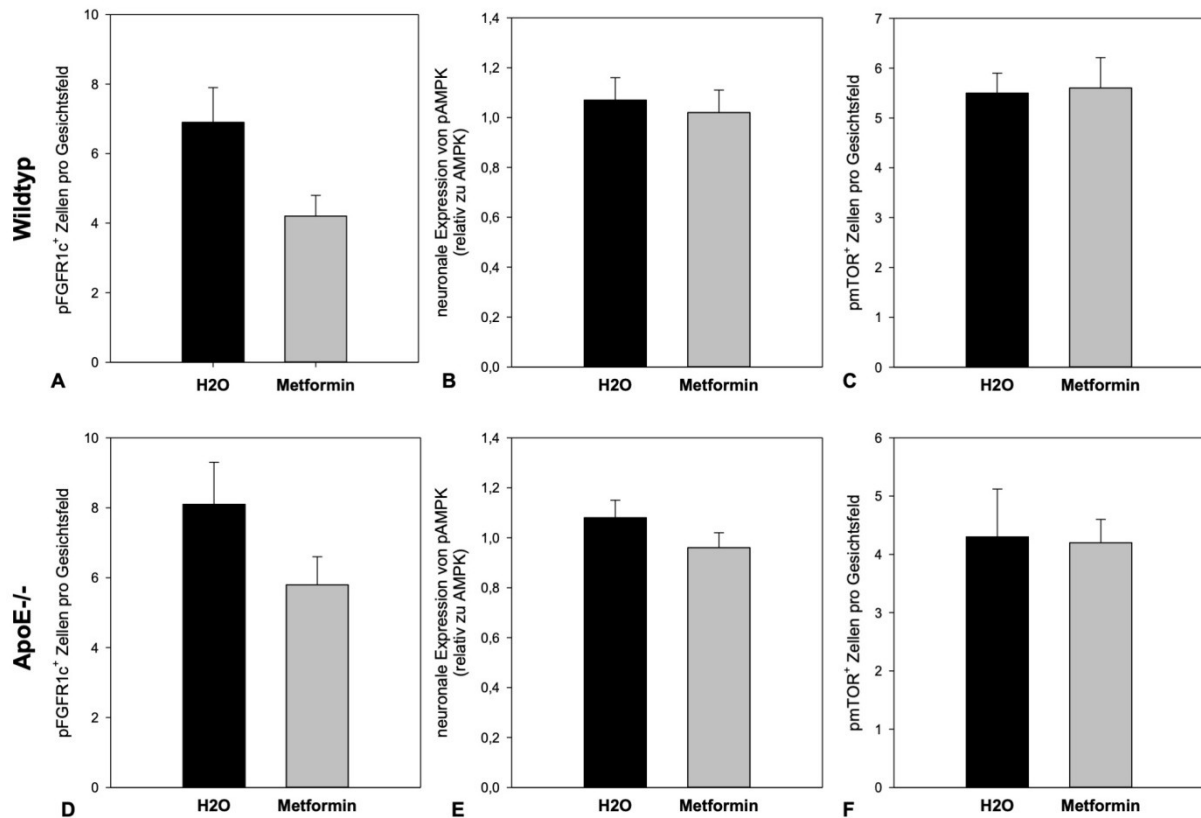


Abbildung 8: Metformin führte zu keiner Aktivierung des FGF21-pAMPK-mTOR Signalweges. A+D) Graphische Darstellung der histologischen Auszählung pFGFR1c positiver Zellen im Cortex (400x Vergrößerung) der Mäuse, jeweils n=4. B+E) Nach einer Semidry-Western Blot erfolgte eine densitometrische Auswertung der relativen neuronalen Proteinexpression von pAMPK, jeweils n=4. C+F) Histologische Auszählung pmTOR positiver Zellen im Cortex (400x Vergrößerung) Wildtyp: jeweils n=7, ApoE^{-/-} Kontrolle n=6, ApoE^{-/-} Metformin n=8. Tiere des 18 Wochen Experiments MW±SEM, t-Test: keine signifikanten Unterschiede.

Um zu erfahren, ob es zu einer Aktivierung der FGF21 Rezeptoren im Gehirn gekommen ist, erfolgte die immunhistologische Auswertung von pFGFR1c positiven Zellen in den Cortices der Mäuse im 18 Wochen Experiment. Es wurden die Zellen pro Gesichtsfeld in 400x Vergrößerung gezählt, die den phosphorylierten und damit aktivierten FGF Rezeptor 1c aufwiesen. Sowohl beim Wildtyp (Abb. 8 A), als auch bei der ApoE^{-/-} Maus (Abb. 8 D) zeigte sich durch die Einnahme von Metformin eine Reduktion in der Anzahl der aktivierten FGF Rezeptoren 1c. Statistische Analysen mittels t-Test ergaben jedoch keinen signifikanten Unterschied.

Nachfolgend sollte untersucht werden, ob Metformin via FGF21 zu einer Erhöhung von neuronalem pAMPK führt. pAMPK ist die aktivierte Form des AMPKs. Ein Anstieg an pAMPK könnte konsekutiv zur Hemmung von mTOR führen. Das bedeutet, dass weniger phosphoryliertes und damit aktives mTOR vorliegen würde. Die Inhibition von mTOR kann nachfolgend zu einer Herabsetzung der Konzentration an hyperphosphoryliertem Tau führen.

Um den Anteil an phosphorylierten AMPK zu bestimmen, wurde ein Quotient aus pAMPK und AMPK gebildet. Die Mittelwerte sind in Abb. 8 B und E dargestellt. Metformin zeigte hier weder beim Wildtyp, noch bei der ApoE^{-/-} Maus einen Einfluss auf die neuronale Expression von pAMPK.

Es erfolgte zudem eine immunhistologische Auswertung der pmTOR positiven Zellen der Cortices der 18 Wochen Therapiegruppe. Im histologischen Präparat wurden alle pmTOR positiven Zellen pro Gesichtsfeld bei 400x Vergrößerung gezählt. Anhand der ausgezählten Zellen aller Gesichtsfelder wurde für jede Gruppen ein Durchschnittswert ermittelt und in Abb. 8 C und F dargestellt. Hier konnten weder beim Wildtyp noch bei der ApoE^{-/-} Maus Unterschiede zwischen der jeweiligen Interventionsgruppe (Metformin) zur Kontrollgruppe (H₂O) gesehen werden. Einen Einfluss von Metformin auf die mTOR Aktivität konnte demnach nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend kam es durch Metformin zu einer Herunterregulierung der FGF21 Rezeptoren. Die Auswertungen von pAMPK und pmTOR ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Interventionsgruppen sowohl beim Wildtyp, als auch bei der ApoE^{-/-} Maus. Metformin führte demnach zu keiner Aktivierung des FGF21-pAMPK-mTOR Signalweges.

3.7 NEURODEGENERATION UND -INFLAMMATION

Um die Tauopathie zu erfassen, wurde die Proteinexpression von Tau näher untersucht. Außerdem erfolgte eine immunhistologische Aufarbeitung der Hirnproben. Untersucht wurden die Synapsen, die Anzahl der Neurone und die Entzündung.

3.7.1 TAU

Aus vorgehenden Arbeiten ist bekannt, dass ApoE^{-/-} Tiere eine erhöhte Konzentration von phosphorylierten Tau im Vergleich zum Wildtyp aufweisen. Dies und der Einfluss von Metformin auf die Tauphosphorylierung wurde durch die Proteinexpressionsanalyse

untersucht. Es sollte gezeigt werden, ob es durch Metformin zu einer Neuroprotektion im Sinne einer pTau-Reduktion kommt.

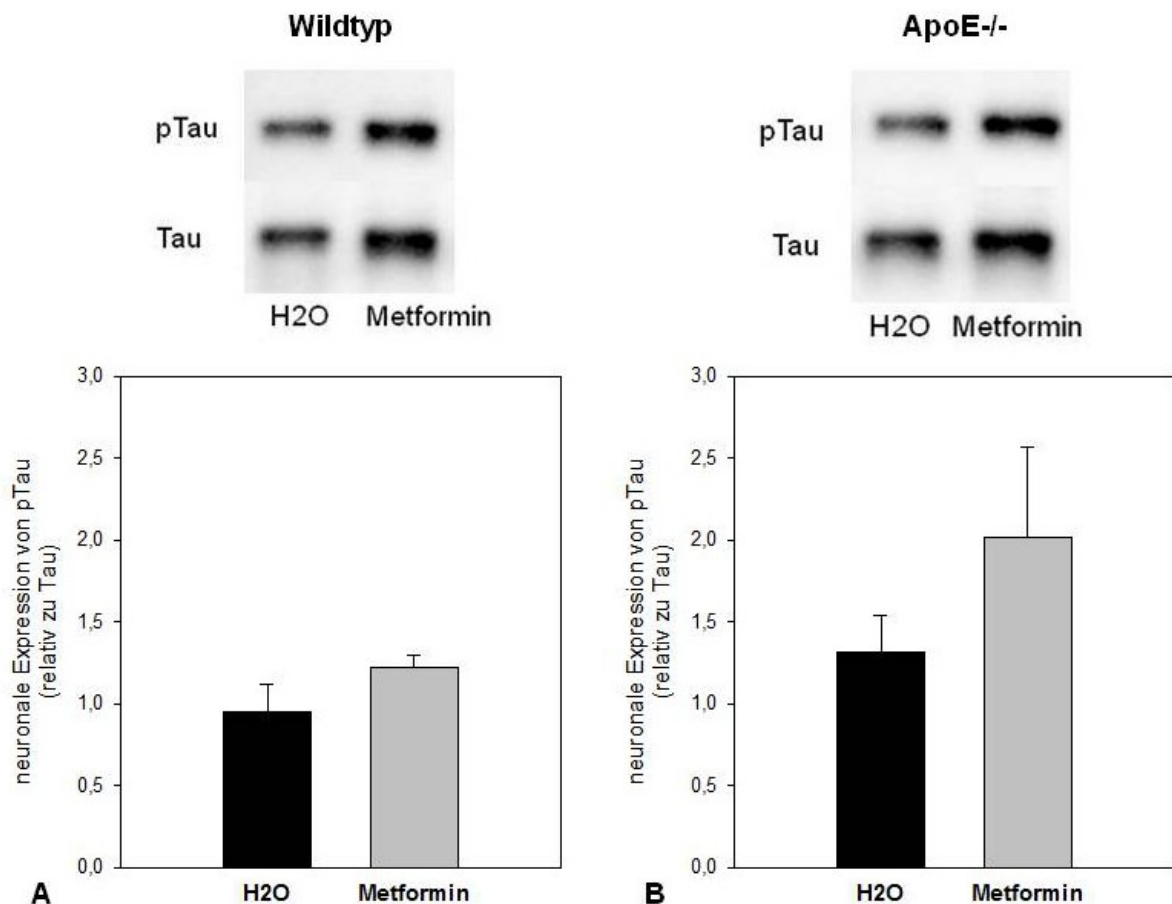


Abbildung 9: Tendenzielle Erhöhung von pTau durch Metformin. Semidry-Western Blot und densitometrischer Vergleich der relativen neuronalen Proteinexpression von pTau von den Tieren des 18 Wochen Experiments. Die Signale wurden gegen Tau normiert. Gruppengröße: A) Wildtyp jeweils n=7, B) ApoE^{-/-} Kontrolle n=6, ApoE^{-/-} Metformin n=7. MW±SEM. t-Test: Keine signifikanten Unterschiede.

In Abb. 9 sind die Ergebnisse der Proteinexpressionsanalyse von pTau graphisch dargestellt. Das phosphorylierte Tau wurde in Relation zum nicht phosphorylierten Tau gesetzt. Die hypothesierte Reduktion von pTau durch Metformin blieb sowohl beim Wildtyp, als auch bei der ApoE^{-/-} Maus aus. Die Wildtyp-Interventionsgruppe (Metformin) zeigte eine 1,28-fache neuronale Expression von pTau im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe (H₂O). In der ApoE^{-/-} Maus kam es durch Metformin zu einem noch größeren Anstieg der pTau Expression. Hier betrug die neuronale Expression der Interventionsgruppe (Metformin) das 1,53-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe (H₂O). Statistische Analysen ergaben hier keine Signifikanz.

Zusammenfassend kam es vor allem in der ApoE^{-/-} Maus durch Metformin zu einem Anstieg an phosphorylierten Tau. Die Tauopathie wurde demnach durch Metformin tendenziell verstärkt.

3.7.2 NEUN

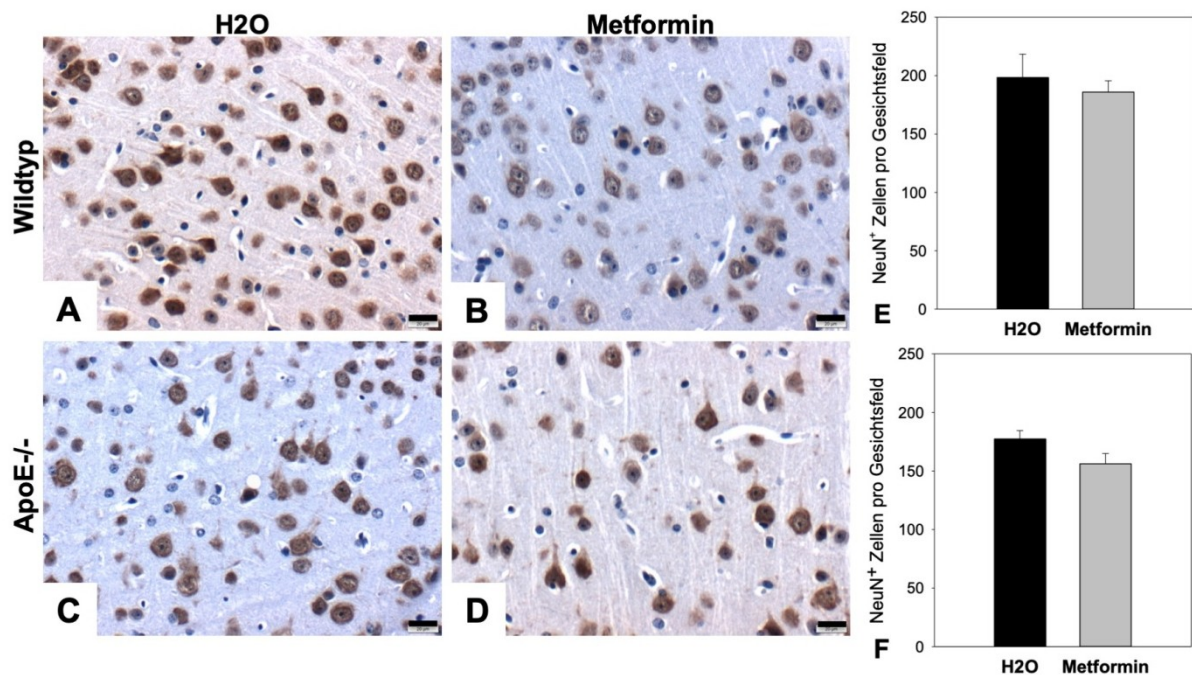


Abbildung 10: Tendenzieller Verlust an Neuronen durch Metformin. Immunhistologische Aufarbeitung der Cortices zur Darstellung NeuN positiver Zellen. Verglichen wurden die 4 Gruppen des 18 Wochen Experiments. A-D) Exemplarische Darstellung der Immunhistologischen NeuN Auswertung der Cortices. 400 x Vergrößerung, schwarzer Balken entspricht 20 µm. A) Wildtyp-Kontrollgruppe B) Wildtyp-Interventionsgruppe C) ApoE-/- Kontrollgruppe D) ApoE-/- Interventionsgruppe. Graphische Darstellung der Mittelwerte der einzelnen Gruppen an NeuN positiven Zellen pro Gesichtsfeld E) im Wildtyp, jeweils n=7 und F) in der ApoE-/- Maus, ApoE-/- Kontrolle n=6, ApoE-/- Metformin n=8. MW±SEM. t-Test: keine signifikanten Unterschiede.

Die immunhistologische Untersuchung erfolgte mittels Antikörper, die sich gegen NeuN (*engl. Neuronal Nuclei*) richten. NeuN-Antikörper dienten der Darstellung und Auszählung von Neuronen in der Großhirnrinde der 4 Versuchsgruppen aus der 18 Wochen Therapiegruppe. Ein brauner Farbstoff diente zur Darstellung der Antikörper. Exemplarisch ist ein immunhistologisches Bild pro Gruppe dargestellt. Für jedes Versuchstier wurden die NeuN positiven Zellen pro Gesichtsfeld ausgezählt und auf einen Wert gemittelt, aus diesen dann ein Durchschnittswert für die einzelnen Versuchsgruppen errechnet wurde (Abb. 10 A-F).

Beim Wildtyp zeigte die Interventionsgruppe (Metformin) einen Neuronenverlust um 6 % im Vergleich zu Kontrollgruppe (H₂O). Bei der ApoE-/- Maus kam es durch Metformin zu einer Reduktion der Neuronenzahl um sogar 12 % im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Interventionsgruppen tendenziell weniger Neuronen aufwiesen als die Kontrollgruppen, was auf eine mögliche Neurodegeneration hinweist.

3.7.3 PSD-95

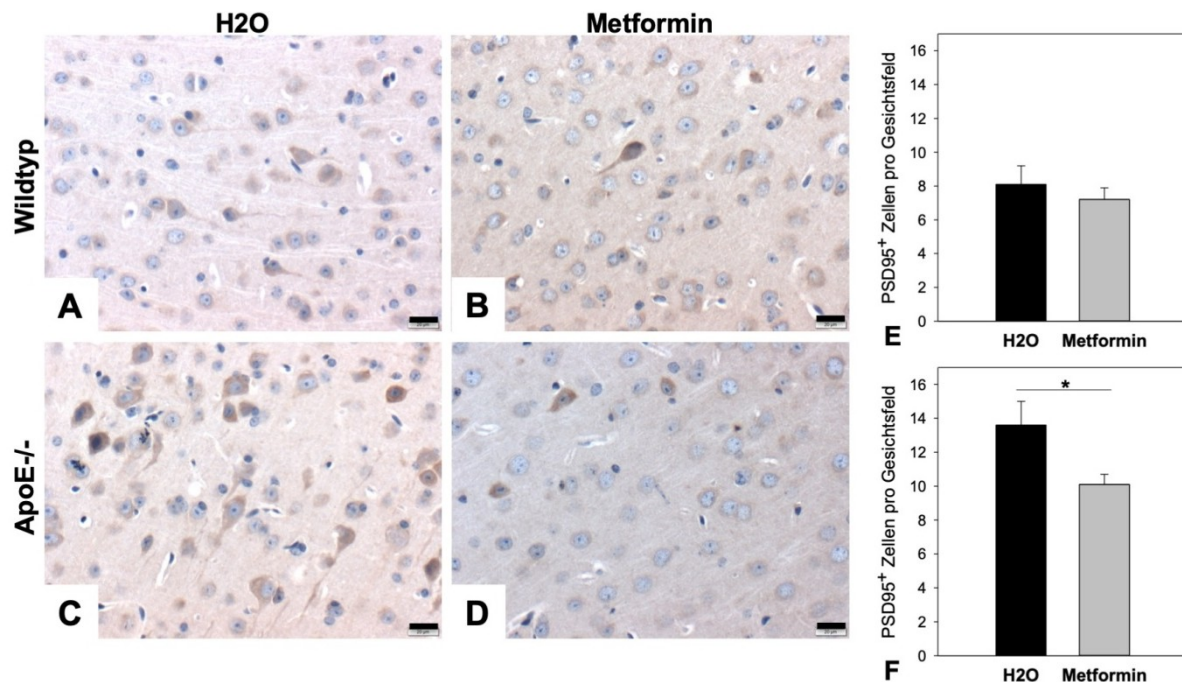


Abbildung 11: Metformin führte zum Synapsenverlust. Immunhistologischer Nachweis PSD95 positiver Zellen im Cortex der Tiere aus dem 18 Wochen Experiment. A-D) Exemplarische Darstellung der immunhistologischen PSD95 Auswertung der Cortices. 400 x Vergrößerung, schwarzer Balken entspricht 20 µm. A) Wildtyp-Kontrollgruppe B) Wildtyp-Interventionsgruppe C) ApoE-/- Kontrollgruppe D) ApoE-/- Interventionsgruppe. Graphische Darstellung der ermittelten Mittelwerte der einzelnen Gruppen an PSD95 positiven Zellen pro Gesichtsfeld im E) Wildtyp, jeweils n=7 und F) ApoE-/- Maus, ApoE-/- Kontrolle n=6, ApoE-/- Metformin n=8. MW±SEM. t-Test: *p<0,05

Immunhistologische Untersuchung des Cortex mit der Darstellung PSD95 (*postsynaptic density protein 95*) positiver Zellen. PSD95 dient als Marker für Synapsen. In der immunhistologischen Auswertung erkennt man die PSD95-positiven Zellen anhand des Farbumschlags ins bräunliche. In Abb. 11 A-D sind exemplarisch ein Ausschnitt aus dem Cortex der jeweiligen Versuchsgruppen dargestellt. Die großen Pyramidenzellen sind anhand ihrer pyramidenförmigen Zellkörper und dem großen Apikaldendriten zu erkennen.

Es wurden für jedes Tier des 18 Wochen Experiments die PSD95 positiven Zellen pro Gesichtsfeld bei einer 400x Vergrößerung gezählt und daraus ein Gruppendurchschnitt errechnet. Anschließend erfolgte ein Vergleich der Interventionsgruppen, die Metformin erhielten, mit den Kontrollgruppen, die Wasser bekamen. Während die Gabe von Metformin im Wildtyp keinen Einfluss auf PSD 95 und folglich auf die Synapsen zeigte, kam es bei der ApoE-/- Maus zu einem Synapsenverlust um 26 %. Hier konnte mittels dem t-Test ein signifikanter Unterschied ermittelt werden (P=0,025).

Metformin führte in der ApoE^{-/-} Maus zu einer Reduktion der PSD95 positiven Zellen und demnach zu einem signifikanten Synapsenverlust.

3.7.4 GFAP

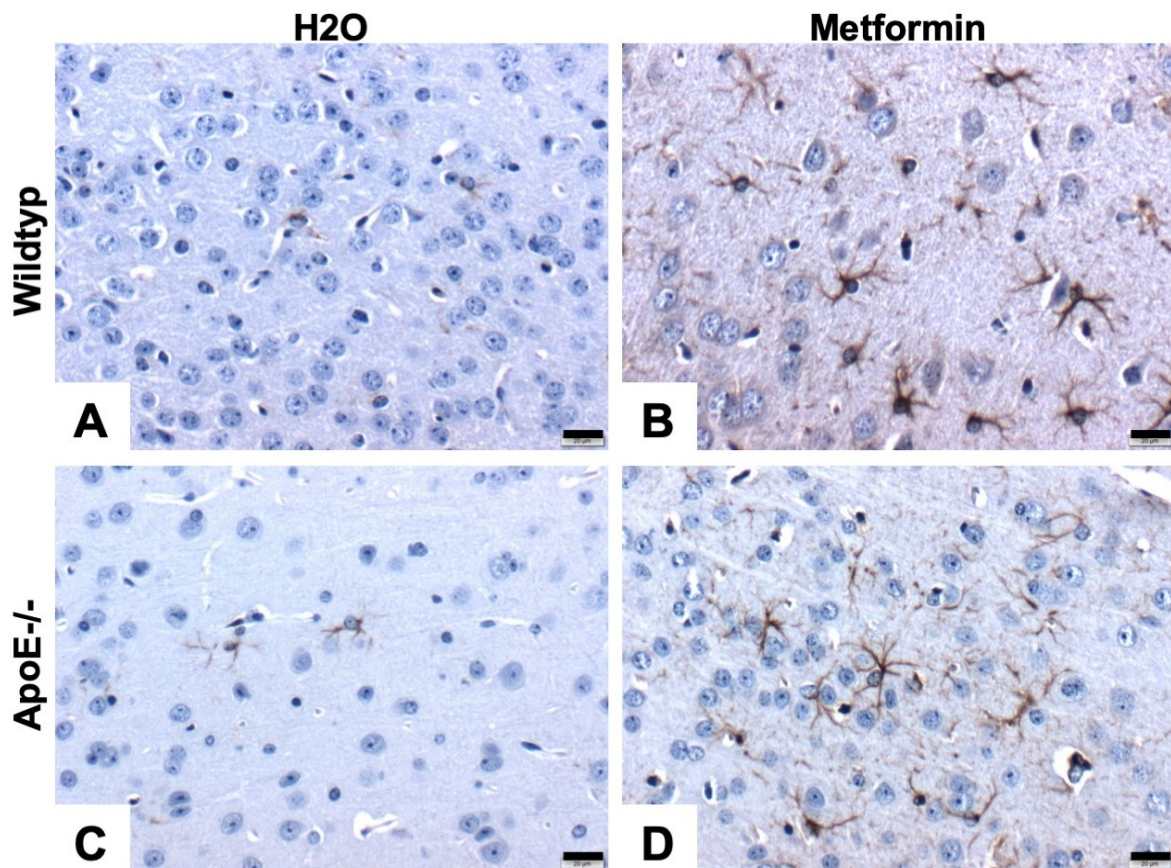


Abbildung 6: Zunahme der neuronalen Entzündung durch Metformin. Immunhistologische Auswertung GFAP positiver Zellen im Cortex. A-D) Exemplarische Darstellung der immunhistologischen GFAP Auswertung der Cortices. 400 x Vergrößerung, schwarzer Balken entspricht 20 µm. A) Wild-Kontrollgruppe B) Wildtyp-Interventionsgruppe C) ApoE^{-/-} Kontrollgruppe D) ApoE^{-/-} Interventionsgruppe.

Es erfolgte eine immunhistologische Aufarbeitung der Hemisphären zur Untersuchung GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) positiver Zellen. GFAP dient in diesem Experiment als Marker für Entzündung. Eine Auszählung der GFAP positiven Zellen erfolgte hier nicht, da eine vergleichbare Auszählung nicht möglich war.

Dennoch konnte ein deutlicher Anstieg an GFAP positiver Zellen in der Interventionsgruppe (Metformin) beider Mausstämme im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe beobachtet werden. Durch die Behandlung von Metformin kam es demnach zu einem Anstieg der Entzündung im zentralen Nervensystem.

3.8 EINFLUSS VON METFORMIN AUF DEN PERIPHEREN FETTSTOFFWECHSEL

In dieser Studie wurde mittels ELISA der Einfluss von Metformin auf den peripheren Fettstoffwechsel analysiert. Auch hier wurden nur die Tiere des 18 Wochen Experiments untersucht.

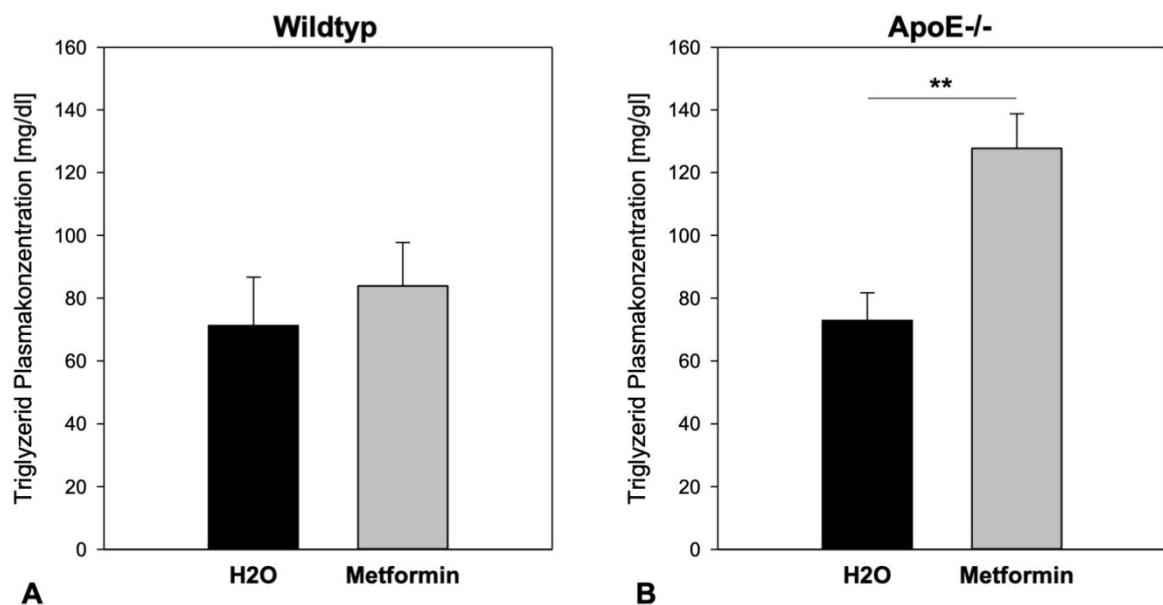


Abbildung 13: Metformin führte zu höheren Triglyzeridwerte. Mittels ELISA bestimmte Konzentration von Triglyzerid im Plasma, das nach Ablauf des 18 Wochen Experiments den Mäusen entnommen wurde. Gruppengröße: A) Wildtyp jeweils n=4 und B) ApoE -/- Maus jeweils n=4. MW±SEM. t-Test: **p<0,01.

In Abb. 13 sind die durchschnittlichen Triglyzerid Plasmakonzentration der einzelnen Versuchsgruppen dargestellt. Im Wildtyp kam es zu keiner signifikanten Veränderung der Triglyzerid Plasmawerte in der mit Metformin therapierten Gruppe. Bei der ApoE-/- Maus zeigte sich dagegen in der Interventionsgruppe (Metformin) ein signifikanter Anstieg (P=0,08) der Triglyzerid Plasmawerte um 75 %.

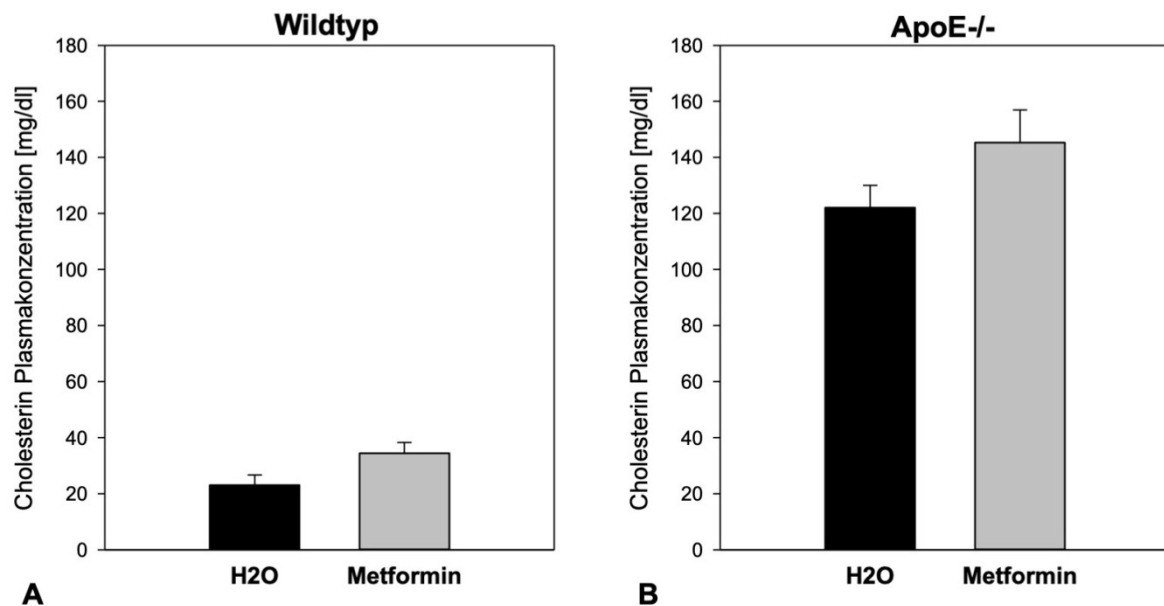


Abbildung 14: Metformin führte zu einem nicht signifikanten Anstieg der Cholesterinwerte. Mittels ELISA bestimmte Konzentration von Cholesterin im Plasma. Gruppengröße: A) Wildtyp jeweils n=7 und B) ApoE-/- jeweils n=6. MW±SEM. t-Test: keine signifikanten Unterschiede.

Die Ergebnisse der Analyse der Cholesterin Plasmakonzentration sind in Abb.14 dargestellt. Ähnlich wie bei der Triglyzerid Plasmakonzentration kam es auch beim Cholesterin durch Metformin zu einer leicht erhöhten Plasmakonzentration. Desweiteren zeigte der direkte Vergleich der Mausstämmen (hier nicht dargestellt), dass die ApoE-/- Maus, wie in der Literatur beschrieben, signifikant höhere durchschnittliche Cholesterin Plasmakonzentrationen als der Wildtyp aufweist ($P < 0,001$) (32).

Zusammenfassend führte Metformin zu einem signifikanten Anstieg der Triglyzerid Plasmakonzentration in der ApoE-/- Maus. Die Cholesterin Plasmakonzentration zeigte in der ApoE-/- Maus durch Metformin ebenfalls eine Tendenz zur Erhöhung. Im Wildtyp wurde der periphere Lipidhaushalt durch Metformin kaum beeinflusst.

3.9 LIPOGENESE IM GEHIRN

Ob ein Zusammenhang zwischen der Neurodegeneration/ -inflammation und einer möglichen lipogenen Wirkung von Metformin besteht, sollte im folgenden untersucht werden.

3.9.1 LIPIDSYNTHESE

Im Gehirn wurde die an der Regulation der Lipidsynthese beteiligten Faktoren und Enzyme mittels RT-qPCR untersucht. LXRα ist an der Regulation der Lipidhomöostase beteiligt.

LXR α führt unter anderem über eine Aktivierung von SREBP-1c zur erhöhten Expression lipogener Enzyme, wie zum Beispiel der Fettsäuresynthase.

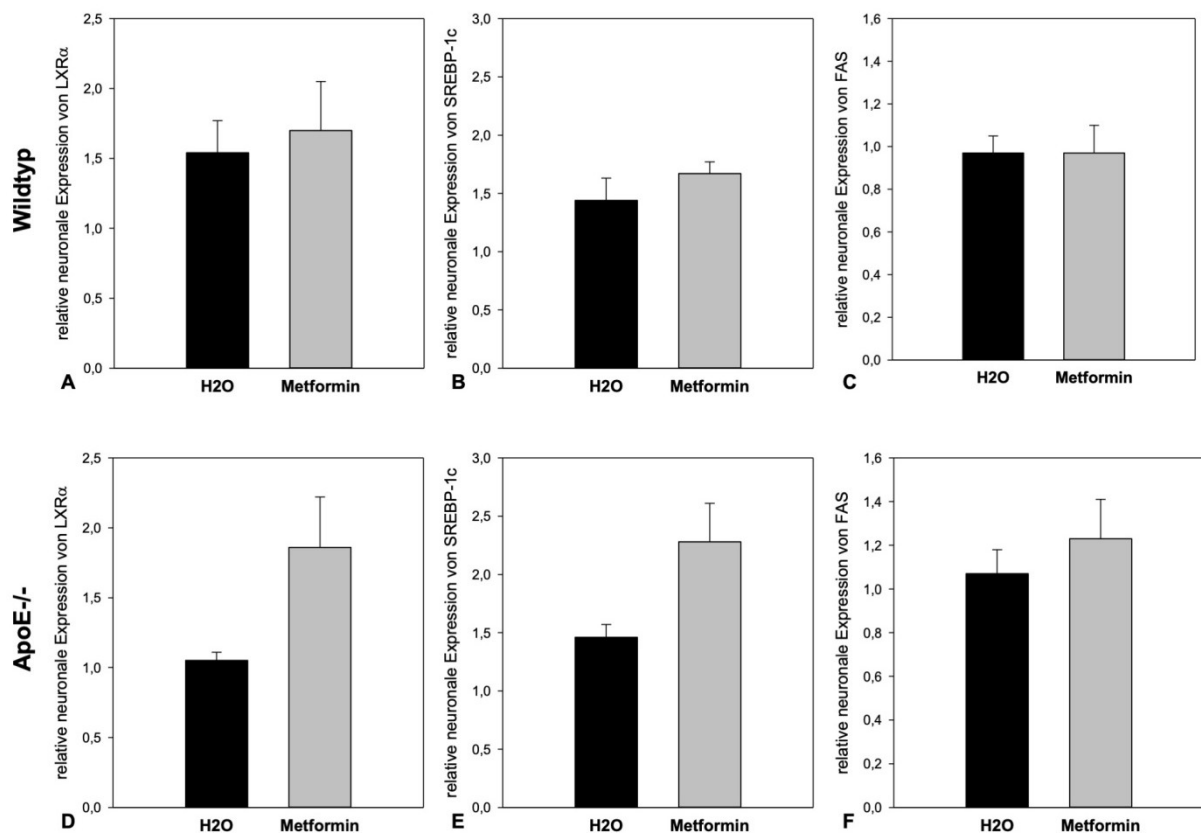


Abbildung 15: Tendenzielle Erhöhung der Enzyme der Lipidsynthese durch Metformin. Darstellung der relativen neuronalen Genexpression von A+D) LXR α , B+E) SREBP-1c und C+F) Fettsäuresynthase (FAS) der Tiere des 18 Wochen Experiments. Gruppengröße: Wildtyp-Kontrolle n=8, Wildtyp-Metformin n=7, ApoE $^{-/-}$ Kontrolle n=6, ApoE $^{-/-}$ Metformin n=8. MW \pm SEM. t-Test: keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Um zu sehen, ob Metformin zu einer Hochregulation von LXR α führt, erfolgte eine Expressionsanalyse. Dargestellt sind in Abb. 16 A und D die relativen Werte, ermittelt nach der $\Delta\Delta$ CT-Methode. Während die Gabe von Metformin zu keiner Veränderung der Expression von LXR α im Wildtyp führte, stieg die Expression bei der ApoE $^{-/-}$ Maus um das bis zu 2-fache an.

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse von SREBP-1c sind in Abb. 15 B und E dargestellt. Im Wildtyp konnte auch hier keine veränderte neuronale Expression durch die Gabe von Metformin beobachtet werden. Bei der ApoE $^{-/-}$ Maus kam es dagegen durch Metformin zu einen 1,6-fachen Anstieg der neuronalen Expression von SREBP-1c im Vergleich zur ApoE $^{-/-}$ Kontrollgruppe (H $_2$ O).

Die Ergebnisse der relativen neuronalen Genexpression von der Fettsäuresynthase (FAS) sind in der Abb. 16 C und F abgebildet. Beim Wildtyp zeigten sich in der Interventionsgruppe

(Metformin) eine identische Expressionsrate wie bei der Kontrollgruppe (H₂O). Dagegen führte die Gabe von Metformin bei der ApoE^{-/-} Maus zu einem Anstieg der neuronalen Expression von FAS um das 1,2-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Zusammenfassend zeigte die Interventionsgruppe (Metformin) der ApoE^{-/-} Maus tendenziell eine erhöhte relative Expression von LXR α , SREBP-1c und FAS im Vergleich zur Kontrollgruppe (H₂O). Im Wildtyp zeigte sich kein Einfluss von Metformin auf die Enzyme der Fettsäuresynthese.

3.9.2 CHOLESTERINSYNTHESE

SREBP-2 ist ein Schlüsselprotein bei der Aktivierung der HMG-CoA-Reduktase, welches wiederum die Cholesterinbiosynthese katalysiert. FGF21 soll zur Hemmung von SREBP-2 führen. Ob Metformin via FGF21 einen Einfluss auf SREBP-2 hatte, sollte durch eine RT-qPCR Analyse der neuronalen Genexpression untersucht werden.

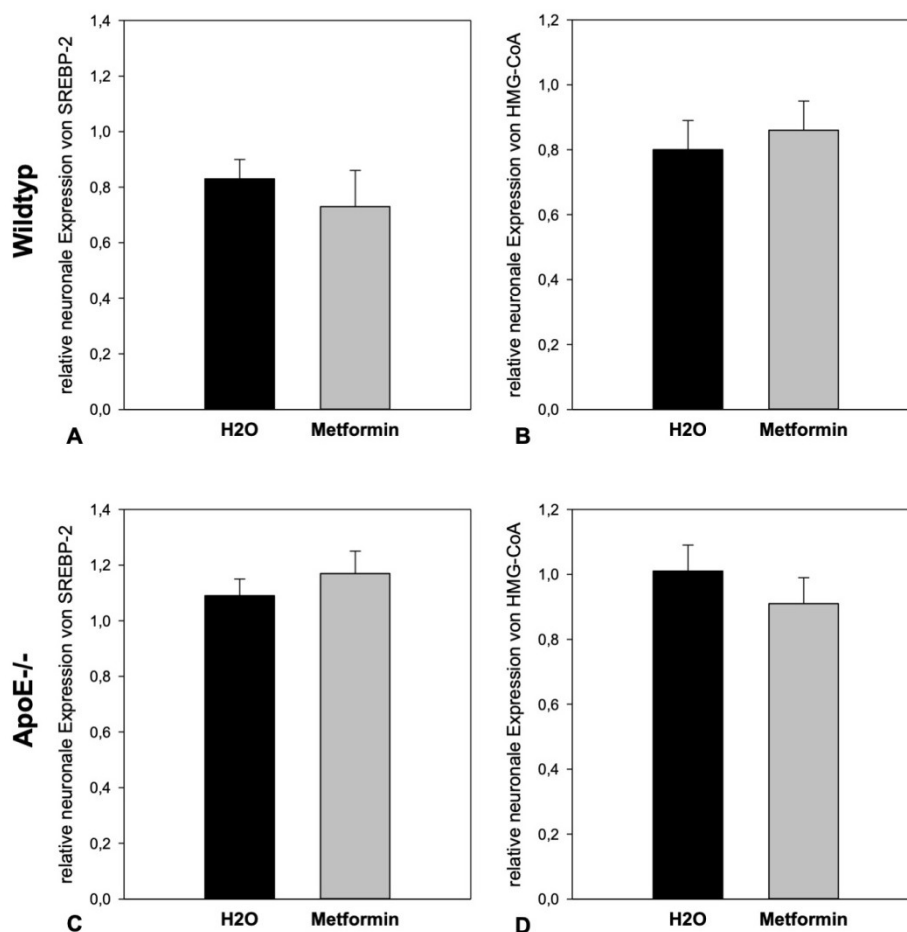


Abbildung 16: Metformin zeigte keinen Einfluss auf die Cholesterinsynthese. RT-qPCR, dargestellt sind die relativen neuronalen Genexpressionen von A+C) SREBP-2 und B+D) HMG-CoA-Reduktase im Gehirn der Tiere vom 18 Wochen Experiment. Gruppengröße: Wildtyp-Kontrolle n=8, Wildtyp-Metformin n=7, ApoE^{-/-} Kontrolle n=6, ApoE^{-/-} Metformin n=8. MW \pm SEM. t-Test: keine gruppenspezifischen Unterschiede.

In Abb. 16 A und C sind die Ergebnisse der SREBP-2 Expressionsanalyse dargestellt. Die Gabe von Metformin zeigte weder beim Wildtyp, noch bei der ApoE^{-/-} Maus einen statistisch signifikanten Einfluss auf die neuronale Expression von SREBP-2. Während beim Wildtyp sich durch Metformin eher ein Trend zur Reduktion der neuronalen Expression von SREBP-2 zeigte, wies die ApoE^{-/-} Interventionsgruppe (Metformin) einen tendenziellen Anstieg der Expression auf.

Die HMG-CoA-Reduktase ist das Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese. Ob Metformin über den LXR α -SREBP-2-Signalweg Einfluss auf die HMG-CoA-Reduktase hat, sollte die Expressionsanalyse zeigen. Die Ergebnisse sind in Abb. 17 B und D dargestellt. Metformin führte hier ebenfalls zu keinen signifikanten Unterschieden in der neuronalen Expression von HMG-CoA im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Zusammengefasst ergaben auch die Expressionsanalyse der an der Cholesterinbiosynthese beteiligten Proteine keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Interventionsgruppen. Metformin führt zu keiner signifikanten Reduktion der Cholesterinbiosynthese im zentralen Nervensystem (ZNS). Dies entspricht auch den Ergebnissen der peripheren Cholesterin Plasmakonzentration.

3.10 LIPOLYSE

Es wurde der Einfluss von Metformin auf die Lipolyse untersucht. Dies bezüglich erfolgte die Analyse der Expression von Enzymen (RT-qPCR), die an der peroxisomalen und mitochondrialen β -Oxidation beteiligt sind.

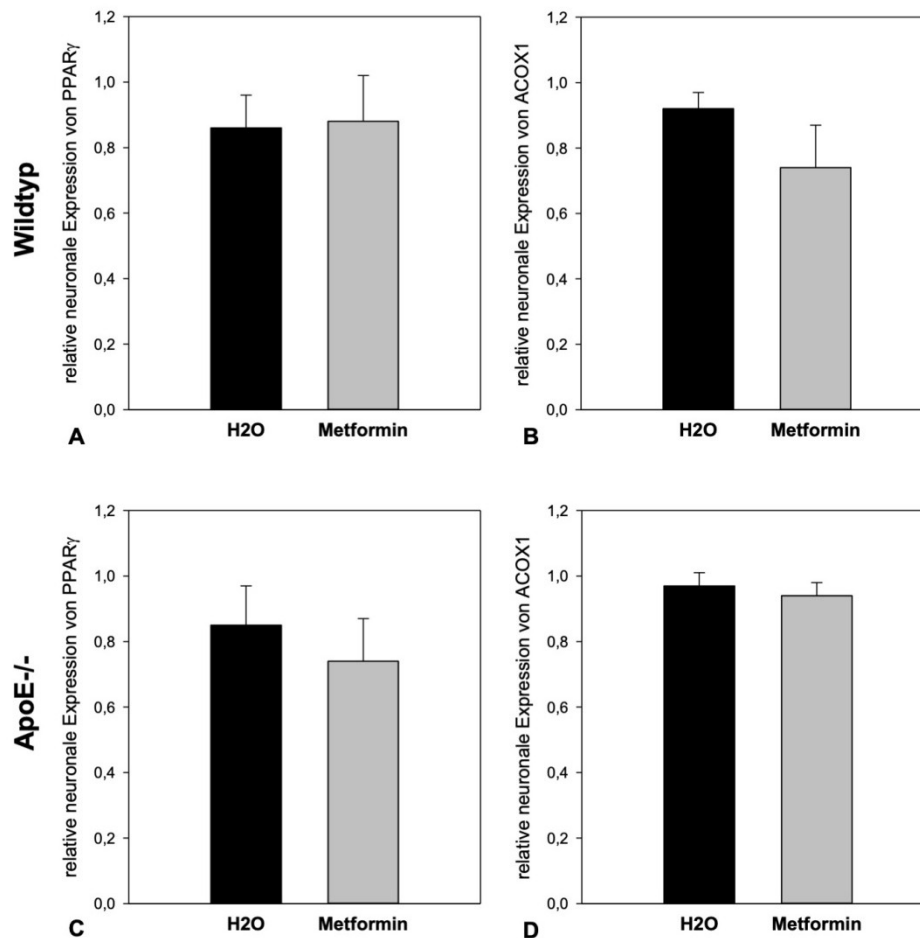


Abbildung 17: Metformin führte zu keiner erhöhten peroxisomalen β -Oxidation. RT-qPCR, graphische Darstellung der neuronalen Expressionsanalyse von A+C) PPAR γ und B+D) ACOX1 der Tiere aus dem 18 Wochen Experiment. Gruppengröße: Wildtyp-Kontrolle n=8, Wildtyp-Metformin n=7, ApoE^{-/-} Kontrolle n=6, ApoE^{-/-} Metformin n=8. MW \pm SEM. t-Test: keine gruppenspezifischen Unterschiede.

PPAR γ ist ein intrazellulären Rezeptor, der als Transkriptionsfaktor fungiert und auch im Gehirn exprimiert wird. Es reguliert unter anderem den Fettstoffwechsel und gilt als Aktivator der β -Oxidation. Die relative neuronale Expression von PPAR γ wurde beim Wildtyp durch Metformin nicht beeinflusst. In der ApoE^{-/-} Maus zeigte die Interventionsgruppe (Metformin) eine geringe Reduktion in der neuronalen Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (H₂O), wenngleich statistische Vergleiche mittels t-Test keinen signifikanten Unterschied ergaben.

PPAR γ kann zur Aktivierung von ACOX1 führen, dem Schlüsselenzym aus der peroxisomalen β -Oxidation. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse von ACOX1 sind in Abb. 17 B und D dargestellt. In der Wildtyp-Maus kam es durch die Gabe von Metformin zu einer Reduktion der neuronalen Expression von ACOX1 um 20 % im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der ApoE^{-/-} Maus zeigte sich durch die Intervention mit Metformin keine Veränderung der Expressionsrate.

Im folgenden wurde der Einfluss von Metformin via PPAR γ (Abb. 17 A und C) auf die Enzyme der mitochondrialen β -Oxidation untersucht.

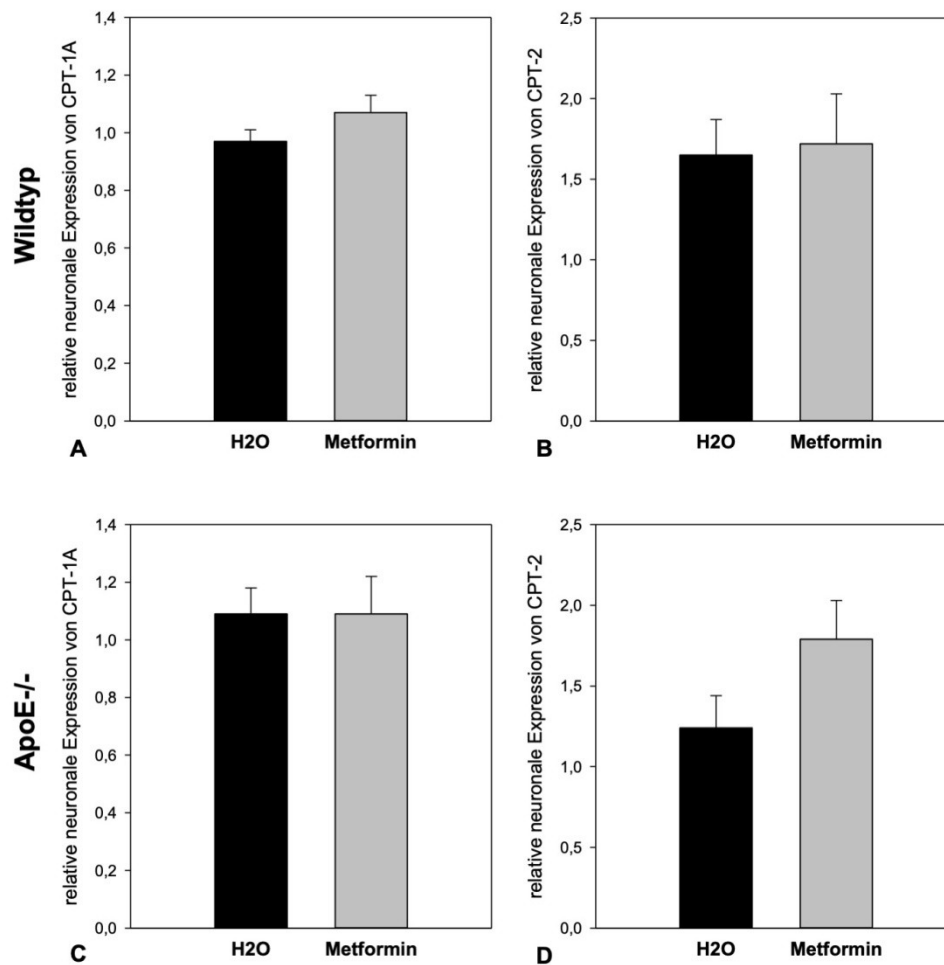


Abbildung 18: Metformin führt zu keiner erhöhten mitochondrialen β -Oxidation. RT-qPCR, Darstellung der relativen neuronalen Expression von A+C) CPT-1A und B+D) CPT-2 der Tiere aus dem 18 Wochen Experiment. Gruppengröße: Wildtyp-Kontrolle n=8, Wildtyp-Metformin n=7, ApoE^{-/-} Kontrolle n=6, ApoE^{-/-} Metformin n=8. . MW \pm SEM. t-Test: keine gruppenspezifischen Unterschiede.

Carnitin Palmitoyltransferase (CPT) ist ein aus Enzymen bestehendes Transportsystem, das Fettsäuren in das Mitochondrium überführt, wo sich die β -Oxidation anschließt. In der relative neuronale Expression von CPT-1A kam es im Wildtyp durch Metformin zu einem leichten Anstieg um 10 % im Vergleich zur Kontrollgruppe. Für die ApoE^{-/-} Kontroll- und Interventionsgruppe ergaben sich für die mittlere relative neuronale Expression dagegen identische Werte. Metformin zeigte demnach auch hier keinen Einfluss.

In Abb. 18 B und D sind die Ergebnisse der Expressionsanalyse von CPT-2 dargestellt. Im Wildtyp kam es durch Metformin zu keinem Anstieg der neuronalen Expression von CPT-2.

In der ApoE^{-/-} Maus führte die Gabe von Metformin zu einem Anstieg der Expression um das 1,4-fache, jedoch ebenfalls ohne statistische Signifikanz.

Zusammenfassend führte Metformin zu keiner neuronalen Erhöhung von PPAR γ , ebenso wurde die β -Oxidation im ZNS nicht beeinflusst.

3.11 LIPIDEFFLUX

Überschüssige Lipide werden über den ABCA1 Transporter aus der Zelle transportiert. Über LXRA kann es zur Aktivierung von ABCA1 kommen, daher sind die Daten hier erneut aufgeführt.

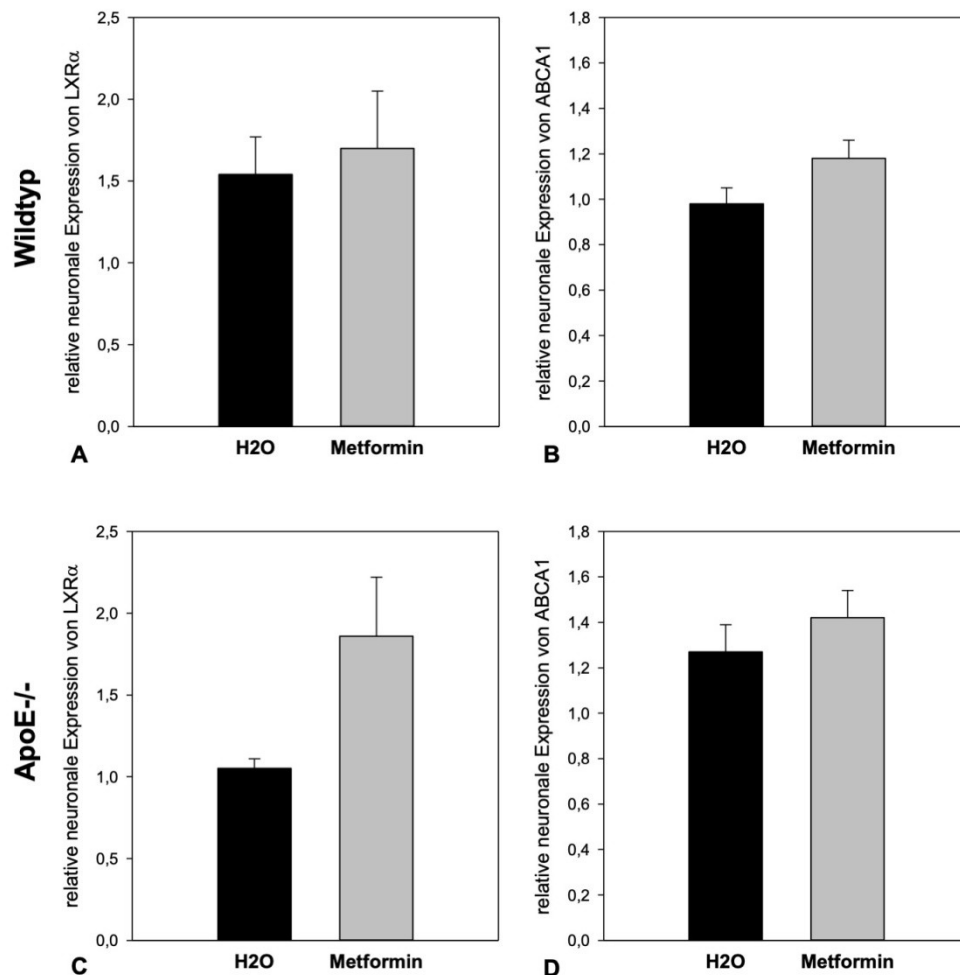


Abbildung 7: Keine signifikante Erhöhung des Lipiefflux durch Metformin. RT-qPCR, Darstellung der relativen neuronalen Genexpression von A+C) LXRA und B+D) ABCA1 im Gehirn der Tiere aus dem 18 Wochen Experiment. Gruppengröße: Wildtyp-Kontrolle n=8, Wildtyp-Metformin n=7, ApoE^{-/-} Kontrolle n=6, ApoE^{-/-} Metformin n=8. MW \pm SEM. t-Test: keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Die Interventionsgruppen beider Mausstämmе zeigten tendenziell erhöhte durchschnittliche LXRA-Expressionswerte. Ob sich das auf den Lipidefflux auswirkte, sollte mittels der

Expressionsanalyse von ABCA1 untersucht werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 19 B und D dargestellt. Weder beim Wildtyp noch bei der ApoE^{-/-} Maus konnte eine signifikante Veränderung der Expressionsrate von ABCA1 gesehen werden. Metformin zeigte demnach keinen Einfluss den Lipidefflux.

IV. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung von oral appliziertem Metformin auf das zentrale Nervensystem in der ApoE^{-/-} Maus untersucht. Die ApoE^{-/-} Maus ist ein etabliertes Mausmodell für die Dyslipidämie und die Tauopathie. Ziel dieser Studie war es zu analysieren, welchen Einfluss Metformin auf die Dyslipidämie und auf die Tauopathie in der ApoE knockout Maus hat und inwieweit eine mögliche neuroprotektive Wirkung vermittelt wird.

Metformin wurde erstmalig im Jahre 1922 synthetisiert und gehört zur Stoffgruppe der Biguanide (79). Es wird zur Therapie von DM Typ 2 eingesetzt, da es zu einer Reduktion von pathologisch erhöhten Blutzuckerwerten führen kann und eine gewichtsreduzierende Wirkung zeigt (3,69). Im Vergleich zu anderen oralen Antidiabetika zeigt Metformin eine geringere Hypoglykämiegefahr (80). So kam es auch in dieser Studie durch Metformin zu keinen Veränderungen der durchschnittlichen Blutzuckerwerte, die allesamt im physiologischen Bereich lagen. Da Hypoglykämien einen negativen Effekt auf die Lebensqualität der Patienten haben, ist das Ausbleiben von hypoglykämischen Episoden in der Therapie mit Metformin von großem Vorteil (81). Neben diesen allgemein bekannten Wirkungen von Metformin werden auch neuroprotektive Eigenschaften diskutiert. Diesbezüglich gibt es widersprüchliche Studien. Eine klinische Studien von Ng et al. (2014) konnte eine neuroprotektive Wirkung nach einer Dauertherapie mit Metformin aufzeigen (82). Andere klinische Studien weisen jedoch darauf hin, dass Metformin womöglich einen neurodegenerativen Einfluss hat. So konnte gezeigt werden, dass Patienten, die Metformin einnehmen, ein erhöhtes Risiko aufwiesen, an AD zu erkranken (83). Auch die zunehmende kognitive Einschränkung von Diabetikern wird im Zusammenhang mit Metformin diskutiert (84). In tierexperimentellen Studien, zum Beispiel am Mausmodell für Diabetes mellitus Typ 2, führte Metformin zwar zu einer Reduzierung von phosphorylierten Tau, eine parallele Verbesserung des räumlichen Lernens und Gedächtnisses blieben in dieser Studie jedoch aus (12). In Wistar-Ratten, die fettreich ernährt wurden, führte Metformin wiederum zu einer gesteigerten Lern- und Gedächtnisleistung (85). Aufgrund dieser konträren Studienlage wurde in dieser Arbeit die Wirkung von Metformin in der ApoE^{-/-} Maus untersucht.

Eine denkbare neuroprotektive Wirkung von Metformin könnte über eine Hochregulierung von FGF21 stattfinden. Es ist bekannt, dass Metformin zu einer erhöhten Expression von FGF21 führen kann. Dies zeigten bereits unterschiedliche Studien. So wiesen Nygaard et al. (2012) nach, dass Metformin die FGF21 Expression in Hepatozyten steigern kann (86). Wang et al. (2017) konnten zudem darlegen, dass die Behandlung von diabetischen Ratten

mit Metformin zu einer Erhöhung der FGF21 Plasmakonzentration führte (70). Angelehnt an vorangegangenen Experimente wurde hier untersucht, ob Metformin ähnlich wie bei einer Kalorienrestriktion via FGF21 neuroprotektive Eigenschaften in der ApoE^{-/-} Maus aufweist (74). FGF21 ist ein Wachstumsfaktor und wird unter anderem benötigt, um bei einer ketogenen Diät die Lipolyse und die Ketogenese zu regulieren (71). Daher überrascht es nicht, dass auch eine Kalorienrestriktion über 65 Wochen in der ApoE^{-/-} Maus zu einer erhöhten FGF21 Plasmakonzentration führte (74). Die Hypothese, dass Metformin in der ApoE^{-/-} Maus zu einem Anstieg an FGF21 führt, konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Nach der Einnahme von Metformin über 18 Wochen konnte ein Anstieg der FGF21 Plasmakonzentration beobachtet werden. In dieser Studie wurden die Mäuse nicht kalorienrestriktiv, sondern *ad libitum* gefüttert. Der Anstieg der FGF21 Plasmakonzentration ist hier demnach nicht auf die Ernährung zurückzuführen.

Die ApoE^{-/-} Maus ist unter anderem ein anerkanntes Tiermodell für das Krankheitsbild der Hypercholesterinämie (32). Das bedeutet, dass die ApoE^{-/-} Maus bei normaler und auch bei reduzierter Cholesterinzufuhr erhöhte Cholesterinplasmakonzentrationen aufweisen (87). FGF21 mit seinen multiplen metabolischen Eigenschaften kann zu einer Reduktion der Cholesterinbiosynthese führen (88,89). Eine Erhöhung von FGF21 durch Metformin könnte hier demzufolge zu einer Korrektur der Dyslipidämie in der ApoE^{-/-} Maus beitragen (86). Desweiteren ist bekannt, dass FGF21 zu einer Gewichtsreduktion führen kann (62). In der hier vorliegenden Arbeit kam es in der mit Metformin behandelten ApoE^{-/-} Maus zu einer Reduktion des Körpergewichtes. Bisher geht man davon aus, dass die gewichtsreduzierende Wirkung von Metformin durch dessen Einfluss auf den Hypothalamus bedingt ist und zur Reduktion der Nahrungsaufnahme führt (90). Allerdings ist zu diskutieren, ob der gewichtsreduzierende Effekt von Metformin in der ApoE^{-/-} Maus möglicherweise auch via FGF21 ausgelöst wird, denn es ist bekannt, dass auch im Hypothalamus FGF21 Rezeptoren vorkommen (91). Eine Aktivierung der FGF21 Rezeptoren im Hypothalamus könnte nachfolgend zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme führen. Diese Hypothese wird durch die Studie von Holstein-Rathlou et al. (2016) untermauert, die zeigen konnten, dass FGF21 knockout Mäuse eine erhöhte Menge an Nahrung zu sich nehmen (92). Die durch Metformin erhöhte FGF21 Plasmakonzentration könnte demnach zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme führen und den gewichtreduzierenden Effekt erklären.

Desweiteren konnte durch Rühlmann et al. (74) gezeigt werden, dass die erhöhte FGF21 Plasmakonzentration eine verstärkte Aktivierung des entsprechenden Rezeptors FGFR1c im Gehirn bewirkte. In der Konsequenz ergab sich daraus eine Aktivierung des AMPK-mTOR Signalweges, mit konsekutiver Neuroprotektion in Form einer gesteigerten synaptischen

Plastizität und verbesserter kognitiver Leistung. Obwohl es in dieser Studie durch Metformin in der ApoE^{-/-} Maus ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg von FGF21 kam, blieb eine Aktivierung des FGFR1c-AMPK-mTOR Signalweges aus. Eine mögliche Erklärung könnte der Energiehaushalt der ApoE^{-/-} Maus liefern.

AMPK selber fungiert als Energiesensor und ein Energiemangel kann zu dessen Aktivierung führen. Nachfolgend kommt es durch AMPK zur Anregung kataboler Stoffwechselreaktionen (8,9,93–95). Liegt ein Energieüberschuss vor, bedarf es möglicherweise keiner Aktivierung von AMPK. In dieser Studie zeigte Metformin vor allem in der ApoE^{-/-} Maus eine lipogene Wirkung mit erhöhten Triglyzeridwerten. Durch die Metformingabe kam es zu einer gesteigerten neuronalen Expression der lipogenen Enzyme LXR α und SREBP-1c in der ApoE^{-/-} Maus. Man kann vermuten, dass aufgrund der verstärkten Lipogenese und des Energieüberschusses es hier keiner Aktivierung des AMPK Signalweges bedarf. Letztlich widerspricht das jedoch der Literatur, die besagt, dass Metformin die Lipidsynthese hemmt (5,6). So führte Metformin in einer Studie an adipösen Mäusen zu einer Reduktion von lipogenen Markern im Fettgewebe (96). Die ApoE^{-/-} Maus ist jedoch durch eine Dyslipidämie charakterisiert, das bedeutet, dass sie aufgrund des ApoE Mangels eine Hypercholesterinämie aufweist (32). Dies bestätigte sich auch in dieser Studie, denn die ApoE^{-/-} Maus zeigte deutlich erhöhte Cholesterinplasmaspiegel im Vergleich zum Wildtyp. Dies führt vermutlich zu einem veränderten Wirkmechanismus von Metformin auf den Lipidmetabolismus in der ApoE^{-/-} Maus. Ergebnisse aus vorangegangenen Untersuchungen im Rahmen einer Bachelorarbeit zeigten, dass auch die hepatische LXR α Expression durch Metformin in der ApoE^{-/-} Maus erhöht war (nicht veröffentlichte Daten). Das bedeutet, dass es nicht nur zu einer Erhöhung der neuronalen Lipogenese gekommen war, sondern auch die periphere Lipogenese durch Metformin gesteigert wurde. Dementsprechend kam es, wie bereits erwähnt, zu erhöhten Triglyzeridkonzentrationen im Plasma. Desweiteren ist in der Literatur bereits beschrieben worden, dass FGF21 zu einer erhöhten Expression von LXR α führen kann (64). Konsekutiv kommt es durch LXR α zu einer gesteigerten Expression von SREBP-1c und dadurch zu einer erhöhten Fettsäuresynthese (50,52). Dies steht im Widerspruch mit der Annahme, dass FGF21 die Lipogenese hemmt. Die verstärkte Verfettung in der Peripherie kann womöglich auf eine erhöhte Expression von LXR α zurückgeführt werden. Die durch Metformin angestiegene FGF21 Plasmakonzentration kann demnach via LXR α zu den erhöhten Triglyzerid Plasmakonzentrationen geführt haben und durch den vorliegenden Energieüberschuss das Ausbleiben der AMPK Aktivierung möglicherweise erklären.

Desweiteren ist LXR α am Lipidefflux beteiligt, jedoch zeigte Metformin in dieser Studie keinen Einfluss auf den Cholesterinefflux. Die Genexpression des Transporters ABCA1, der für den Cholesterinefflux zuständig ist, zeigte sich durch Metformin unverändert. Bei der ApoE $^{-/-}$ Maus kam es zwar durch Metformin zu einem FGF21 Anstieg mit konsekutiver LXR α Erhöhung, ein Anstieg der ABCA1 Expression blieb jedoch aus. Womöglich lässt sich das mit der ApoE Defizienz erklären, denn ApoE wird für den Lipidtransport benötigt und hat einen cholesterinsenkenden Effekt (97). Durch die Bindung von ApoE an ABCA1 wird der Cholesterinefflux aktiviert (98,99). Ohne ApoE, welches das am häufigsten vorkommende Lipoprotein im Gehirn ist, kann über ABCA1 unter Umständen kein Efflux stattfinden. Eine Hochregulierung von ABCA1 würde daher hier vermutlich auch keinen Effekt zeigen. Dies zeigten auch die Ergebnisse der Studie von Joyce et al. (2002). Eine Überexpression von ABCA1 in der ApoE $^{-/-}$ Maus zeigten nur minimale Effekte auf den Lipidhaushalt (100). Die ApoE Defizienz und der fehlende Anstieg des reversen Cholesterintransportes und auch das Ausbleiben einer gesteigerten Lipolyse/ β -Oxidation (PPAR γ , ACOX1, CPT-1A) fördern letztlich eine Lipidakkumulation. Somit kann geschlussfolgert werden, dass in der ApoE $^{-/-}$ Maus dadurch die bereits bestehende Dyslipidämie verstärkt wird und Metformin hier nicht via FGF21 zu einer Korrektur der Dyslipidämie geführt hat.

Eine Dyslipidämie wiederum könnte über die Induktion einer Entzündung neurodegenerativ wirken. So konnte gezeigt werden, dass eine cholesterinreiche Diät zur erhöhten Zytokinexpression im Hippocampus führen kann. Eine Dyslipidämie vermag demnach die Funktionsleistung des Gehirns negativ beeinflussen (101,102). Da ApoE eine antiinflammatorische Wirkung besitzt, kann ein Mangel zusätzlich zur Verstärkung entzündlicher Prozesse beitragen (103). Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen dieser Studie wieder, denn die ApoE $^{-/-}$ Maus zeigte auch ohne Metformin vermehrt neuronale GFAP positive Zellen im Vergleich zum Wildtyp. GFAP diene dabei als Marker für das Vorliegen einer Entzündung. Die durch Metformin verstärkte Lipogenese könnte nachfolgend für den weiteren Anstieg der zerebralen Gliose, wie in dieser Arbeit anhand der erhöhten GFAP positiven Zellzahl in der mit Metformin behandelten ApoE $^{-/-}$ Maus gezeigt, verantwortlich sein.

Weiterführend wäre es denkbar, dass eine solche Neuroinflammation die FGF21 Responsivität schwächt. Dies könnte eine ausbleibende Aktivierung des FGFR1c-AMPK-mTOR Signalweges, trotz eines Anstieges der FGF21 Plasmakonzentration, ebenfalls erklären. Denn es ist bekannt, dass es durch die Hemmung von β -Klotho durch TNF- α zu einer FGF21 Resistenz kommen kann (104). TNF- α ist ein proinflammatorisches Zytokin, das auch an neuroinflammatorischen Prozessen beteiligt ist (105). Ein Anstieg der zerebralen

Gliose konnte, wie bereits erwähnt, auch in dieser Studie durch die Metformingabe beobachtet werden. Durch die erhöhte Neuroinflammation kam es auch hier zu einer Hemmung von β -Klotho (nicht veröffentlichte Daten). Dies könnte - wie in der Literatur beschrieben - eine mögliche FGF21 Resistenz erklären (104). FGF21 übt seinen metabolischen Einfluss durch seine Wirkung auf unterschiedliche Rezeptoren aus. Die Hauptrolle spielt dabei der Rezeptor FGFR1 (106,107). Ein Defekt, das Fehlen oder auch eine Inaktivität des Rezeptors könnte einen ausbleibenden Effekt von FGF21, ähnlich der Insulinresistenz bewirken. Die Gabe von Metformin hatte in der ApoE^{-/-} Maus zur Folge, dass die Anzahl der aktivierten FGFR1c Rezeptoren im Gehirn sanken. Dies könnte ein Ausbleiben der Wirkung von FGF21 zur Folge haben.

FGF21 führt zudem zu einer Stimulation des Glukosetransporters-1 (glut-1) (108). Dieser spielt eine entscheidende Rolle bei der neuronalen Glukoseaufnahme (109). Reduzierte glut-1 Konzentrationen im Gehirn werden daher mit AD assoziiert (110,111). Eine FGF21 Resistenz könnte, durch die ausbleibende Stimulation, auch zu einer Reduktion von glut-1 beitragen und damit den neuronalen Glukosestoffwechsel stören. Möglicherweise kann demnach die AD mit einer neuroinflammatorisch induzierten FGF21 Resistenz assoziiert werden.

Ein weiteres typisches Kennzeichen der AD sind neurofibrilläre Tangles, die durch eine abnorm erhöhte Hyperphosphorylierung des Mikrotubuli assoziierten Proteins Tau entstehen (110). In einem anderen transgenen Mausmodell der Tauopathie (P301S) konnte durch Metformin eine Aktivierung des AMPK-mTOR Signalweges, mit konsekutiver Reduktion von phosphorylierten Tau beobachtet werden (112). Jedoch zeigte sich durch die Metformingabe kein positiver Einfluss im Bezug auf die Hirnatrophie und die Gedächtnisleistung (12,112). Sowohl in der ApoE^{-/-} Maus als auch im Wildtyp konnten diese Ergebnisse aufgrund der ausbleibenden AMPK Aktivierung nicht reproduziert werden. Folglich konnte in dieser Arbeit auch keine Reduzierung vom phosphorylierten Tau durch Metformin gezeigt werden. In der ApoE^{-/-} Maus kam es sogar zu einem Anstieg an phosphorylierten Tau. In diesem Experiment verstärkte Metformin demnach die bereits bestehende Tauopathie in der ApoE^{-/-} Maus. Eine Ursache für die gesteigerte Tauopathie durch Metformin könnte die bereits erwähnte lipogene Wirkung in der ApoE^{-/-} Maus sein. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass Julien et al. (2010) zeigen konnten, dass eine fettreiche Diät, welche zu einer Lipidakkumulation führen kann, zu einer Verstärkung der Tauopathie beiträgt (113). In dieser Arbeit verstärkte Metformin nicht nur die bereits bestehende Tauopathie in der ApoE^{-/-} Maus. Es zeigte sich gleichzeitig in der mit Metformin behandelten ApoE^{-/-} Maus einen Verlust an NeuN und PSD95 positiven Zellen sowie eine reduzierte Proteinexpression von

VAMP2 und Synapsin I (Daten nicht gezeigt). VAMP2 und Synapsin I sind Proteine, die an der präsynaptischen Transmitterfreisetzung beteiligt sind (114). In der Summe spricht dies für einen Verlust der neuronalen Plastizität. Dass es durch Metformin zu einem Verlust der synaptischen Plastizität kommen kann, zeigte auch schon die Studie von Barini et al. (112). Widersprüchliche Studien dagegen gibt es zum Einfluss von Metformin auf die Neuronenzahl. An DIO (*engl.* diet-induced obese) Mäusen konnte durch die Gabe von Metformin eine Erhöhung von NeuN positiven Zellen verzeichnet werden (115). Sowohl in dem DIO Mausmodell, als auch in der ApoE^{-/-} Maus liegt eine Dyslipidämie vor (32,116). In der ApoE^{-/-} Maus zeigte Metformin jedoch keinen positiven Einfluss auf den Lipidhaushalt. Aufgrund der unterschiedlichen Wirkung von Metformin auf den Lipidhaushalt der beiden Mausstämmen (DIO, ApoE^{-/-}), ist eine genetische Abhängigkeit von der Wirkweise von Metformin zu vermuten. Die gesteigerte Dyslipidämie in der ApoE^{-/-} Maus durch Metformin hat letztlich eine neurodegenerative Wirkung zur Folge und könnte den Neuronenverlust erklären.

Zusammengefasst kam es durch Metformin in der ApoE^{-/-} Maus zu einer gesteigerten Dyslipidämie und Tauopathie. Desweiteren zeigten die mit Metformin behandelten ApoE^{-/-} Mäuse eine erhöhte Neuroinflammation sowie eine FGF21-Resistenz, was letztlich in der Summe in einer erhöhten Neurodegeneration münden kann. Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie kann die Hypothese, dass Metformin neuroprotektiv wirkt, nicht bestätigt werden (115,117–120).

4.1 SCHLUSSFOLGERUNG

Das Ziel dieser Studie, eine mögliche neuroprotektive Wirkung von Metformin via einer Hochregulierung von FGF21 in der ApoE knockout Maus zu zeigen, war demnach nicht möglich. Wie in Abb. 20 dargestellt, fand durch Metformin zwar eine Erhöhung der FGF21 Plasmakonzentration statt, was jedoch zu keiner Aktivierung des FGFR1c-pAMPK-mTOR Signalweges führte. Metformin zeigte dagegen in der ApoE^{-/-} Maus eine lipogene Wirkung mit konsekutiv erhöhter Neuroinflammation. Die Neuroinflammation wiederum begünstigt möglicherweise eine FGF21 Resistenz, mit der Folge, dass der neuronale Glukosestoffwechsel und die neuronale Aktivität reduziert wird. Letztlich spiegelt sich die verminderte Aktivität in der Reduktion von PSD95 und NeuN wider. Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit lassen daher eher eine Verschlechterung der Neuropathie im Sinne einer Neurodegeneration durch Metformin schlussfolgern.

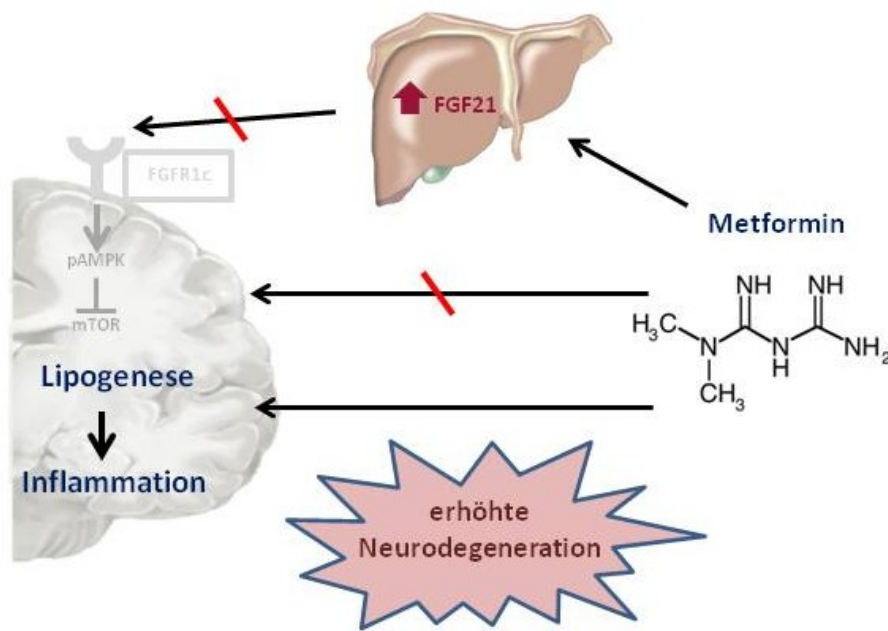


Abbildung 20: Die Wirkung von Metformin in der ApoE-/- Maus. Metformin führte in der ApoE-/- Maus zu einem Anstieg der FGF21-Plasmakonzentration. Eine Aktivierung des FGFR1c blieb jedoch aus. Durch die lipogene Wirkung vom Metformin zeigte die ApoE-/- Maus eine erhöhte Inflammation, die in einer gesteigerten Neurodegeneration mündete.

Patienten, die an DM Typ 2 erkranken, leiden häufig auch an einer Dyslipidämie mit subklinischer Inflammation (121). Gleichzeitig ist die Untersuchung an der ApoE-/- Maus vergleichbar mit Patienten, die das ApoE4-Allel, einem Risikofaktor für die AD, besitzen. Die bereits bestehende Dyslipidämie könnte bei diesen Patienten demnach durch die lipogene Wirkung vom Metformin verstärkt werden und eine erhöhte Neuroinflammation zur Folge haben. Konsekutiv kann es zu einem gesteigerten Verlust von Neuronen und Synapsen, sowie einer erhöhten phosphorylierten Taukonzentration kommen. Klinisch vermag das relevant sein, als dass die Verordnung von Metformin abgewogen und Alternativen eingesetzt werden sollten, um eine mögliche Verschlechterung der AD bei Patienten mit DM Typ 2 zu vermeiden.

V. **ZUSAMMENFASSUNG**

Die Alzheimer-Krankheit ist eine Demenzform, die die Bevölkerung im Alter zunehmend betrifft und die Bewältigung des Alltags der betroffenen Patienten erheblich erschwert, gar eine dauerhafte Pflege nötig macht und letztlich zum Tod führt. Daher rückt die Forschung der Ätiopathogenese und der Untersuchung möglicher Therapieansätze zunehmend in den Fokus. Erkrankungen wie der Diabetes mellitus und die Dyslipidämie werden mit der AD assoziiert. Das Medikament Metformin, welches das Medikament der ersten Wahl bei DM Typ 2 ist, bewirkt nicht nur eine Reduktion des Blutzuckers, sondern beeinflusst auch den Lipidhaushalt. In tierexperimentellen Studien wies Metformin auch positive Eigenschaften in Hinblick auf die Neurodegeneration auf. Es ist bekannt, dass Metformin zu einem Anstieg der FGF21 Plasmakonzentration führen kann. FGF21 wiederum aktiviert den AMPK-mTOR Signalweg und vermittelt darüber eine neuroprotektive Wirkung. Womöglich führt auch der Metformin induzierte Anstieg von FGF21 via AMPK-mTOR zu einer Neuroprotektion. Da in einigen klinischen Studien Metformin auch eine neurodegenerative Wirkung nachgesagt wird, haben wir in dieser Arbeit ApoE^{-/-} Mäuse Metformin verabreicht und auf eine mögliche neuroprotektive Wirkung untersucht.

Die ApoE^{-/-} Maus ist ein etabliertes Tiermodell zur Untersuchung der Dyslipidämie sowie der Tauopathie. Die orale Einnahme von Metformin über 18 Wochen führte in der ApoE^{-/-} Maus zu einer erhöhten Expression lipogener Enzyme (LXR α , SREBP-1c). Konsekutiv kam es durch Metformin zu einem Anstieg der Triglyzeridkonzentration im Plasma, was zu einer erhöhten Neuroinflammation beitrug. Obwohl die ApoE^{-/-} Mäuse, die mit Metformin behandelt wurden, auch eine erhöhte FGF21 Plasmakonzentration aufwiesen, kam es zu keiner Aktivierung des FGFR1c-AMPK-mTOR Signalweges. Die durch Metformin verstärkte Dyslipidämie und Neuroinflammation könnte über die Hemmung von β -Klotho eine FGF21 Resistenz erklären. Desweiteren führte die Einnahme von Metformin zu einem Anstieg von pTau sowie zu einem Verlust an Neuronen und Synapsen. Metformin induziert die Lipogenese und infolgedessen die Neuroinflammation, was zu einer Verstärkung neurogenerativer Prozesse in der ApoE^{-/-} Maus führte.

Die Indikation von Metformin bei Patienten mit DM Typ 2, die simultan auch kognitive Störungen aufweisen, sollte kritisch hinterfragt werden. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Metformin eine bereits bestehende Dyslipidämie verstärken kann, gefolgt von einer gesteigerten neuronalen Entzündungsreaktion und Neurodegeneration. Um eine Progredienz der AD vor allem bei ApoE Risikogruppen zu vermeiden, sollten daher alternative Medikamente erforscht und eingesetzt werden.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, u. a. Medical Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Consensus Algorithm for the Initiation and Adjustment of Therapy: A consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*. 1. Januar 2009;32(1):193–203.
2. Saini V. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 15. Juli 2010;1(3):68.
3. Gunton JE, Delhanty PJD, Takahashi SI, Baxter RC. Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(3):1323–32.
4. Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, u. a. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes*. Dezember 2000;49(12):2063–9.
5. Forouzanmehr F, Salazar G, Patrushev N, Xiong S, Hilenski L, Fei B, u. a. Metformin beyond diabetes: pleiotropic benefits of metformin in attenuation of atherosclerosis. *J Am Heart Assoc*. Dezember 2014;3(6):e001202.
6. Madsen A, Bozickovic O, Bjune JI, Mellgren G, Sagen J V. Metformin inhibits hepatocellular glucose, lipid and cholesterol biosynthetic pathways by transcriptionally suppressing steroid receptor coactivator 2 (SRC-2). *Sci Rep*. 9. November 2015;5:16430.
7. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, u. a. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 2001;
8. Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol*. 2. September 2011;13(9):1016–23.
9. Srivastava RAK, Pinkosky SL, Filippov S, Hanselman JC, Cramer CT, Newton RS. AMP-activated protein kinase: an emerging drug target to regulate imbalances in lipid and carbohydrate metabolism to treat cardio-metabolic diseases. *J Lipid Res*. Dezember 2012;53(12):2490–514.
10. OWEN MR, DORAN E, HALESTRAP AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J*. 2000;348(3):607.
11. Ouyang J, Parakhia RA, Ochs RS. Metformin activates AMP kinase through inhibition of AMP deaminase. *J Biol Chem*. 7. Januar 2011;286(1):1–11.
12. Li J, Deng J, Sheng W, Zuo Z. Metformin attenuates Alzheimer's disease-like neuropathology in obese, leptin-resistant mice. *Pharmacol Biochem Behav*. Juni

- 2012;101(4):564–74.
13. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. Bd. 368, *Lancet*. Elsevier; 2006. S. 387–403.
 14. Annear MJ, Toyne C, McInerney F, Eccleston C, Tranter B, Elliott K-E, u. a. What should we know about dementia in the 21st century? A Delphi consensus study. *BMC Geriatr*. 6. Februar 2015;15:5.
 15. Qiu C, Kivipelto M, Von Strauss E. Epidemiology of Alzheimer's disease: Occurrence, determinants, and strategies toward intervention. Bd. 11, *Dialogues in Clinical Neuroscience*. Les Laboratoires Servier; 2009. S. 111–28.
 16. Davies L, Wolska B, Hilbich C, Multhaup G, Martins R, Simms G, u. a. A4 amyloid protein deposition and the diagnosis of Alzheimer's disease: prevalence in aged brains determined by immunocytochemistry compared with conventional neuropathologic techniques. *Neurology*. November 1988;38(11):1688–93.
 17. Barage SH, Sonawane KD. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*. 2015;52:1–18.
 18. Iqbal K, Liu F, Gong CX, del Alonso AC, Grundke-Iqbal I. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. Bd. 118, *Acta Neuropathologica*. NIH Public Access; 2009. S. 53–69.
 19. Goate A, Chartier-Harlin M-C, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, u. a. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 21. Februar 1991;349(6311):704–6.
 20. Kelleher RJ, Shen J. Presenilin-1 mutations and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci*. 2017;114(4):629–31.
 21. Elshourbagy NA, Liao WS, Mahley RW, Taylor JM. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Januar 1985;82(1):203–7.
 22. Beffert U, Danik M, Krzykowski P, Ramassamy C, Berrada F, Poirier J. The neurobiology of apolipoproteins and their receptors in the CNS and Alzheimer's disease. *Brain Res Rev*. 1998;27:119–42.
 23. Raber J, Huang Y, Ashford JW. ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. Bd. 25, *Neurobiology of Aging*. Elsevier; 2004. S. 641–50.
 24. Mahley R. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* (80-). 29. April 1988;240(4852):622–30.
 25. Boyles JK, Pitas RE, Wilson E, Mahley RW, Taylor JM. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J Clin Invest*. 1985;76(4):1501–13.
-

26. Aoki K, Uchihara T, Sanjo N, Nakamura A, Ikeda K, Tsuchiya K, u. a. Increased expression of neuronal apolipoprotein E in human brain with cerebral infarction. *Stroke*. 1. April 2003;34(4):875–80.
 27. Masliah E. Neurodegeneration in the Central Nervous System of apoE-Deficient Mice. *Exp Neurol*. 1995;
 28. Saher G, Stumpf SK. Cholesterol in myelin biogenesis and hypomyelinating disorders. Bd. 1851, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2015. S. 1083–94.
 29. EH Corder, AM Saunders, WJ Strittmatter, DE Schmechel, PC Gaskell, GW Small, u. a. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* (80-). 1993;261(5123):921–3.
 30. Patrick CB, Krzywkowski P, Ramassamy C, Poirier J, Rapoport SI, Murphy EJ. Phospholipase A 2 activity is decreased selectively in the hippocampus of aged apolipoprotein E deficient mice.
 31. Genisa I, Gordona I, Sehayekb E, Michaelsow DM. Phosphorylation of tau in apolipoprotein E-deficient mice. *Neurosci Lett*. 1995;199:5–8.
 32. Zhang SH, Reddick R, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* (80-). 1992;258(5081):468–71.
 33. Chen X, Gawryluk JW, Wagener JF, Ghribi O, Geiger JD. Caffeine blocks disruption of blood brain barrier in a rabbit model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 3. April 2008;5:12.
 34. Methia N, André P, Hafezi-Moghadam A, Economopoulos M, Thomas KL, Wagner DD. ApoE deficiency compromises the blood brain barrier especially after injury. *Mol Med*. 2001;7(12):810–5.
 35. Groen A, Oude Elferink R, Verkade H, Kuipers F. The ins and outs of reverse cholesterol transport. *Ann Med*. 2004;36(2):135–45.
 36. Oliveira BC de L, Bellozi PMQ, Reis HJ, de Oliveira ACP. Inflammation as a Possible Link Between Dyslipidemia and Alzheimer's Disease. Bd. 376, *Neuroscience*. Pergamon; 2018. S. 127–41.
 37. Reitz C. Dyslipidemia and the risk of Alzheimer's Disease. *Curr Atheroscler Rep*. März 2013;15(3):1–14.
 38. Ni WQ, Liu XL, Zhuo ZP, Yuan XL, Song JP, Chi HS, u. a. Serum lipids and associated factors of dyslipidemia in the adult population in Shenzhen. *Lipids Health Dis*. 14. Juli 2015;14(1):71.
 39. Zambón D, Quintana M, Mata P, Alonso R, Benavent J, Cruz-Sánchez F, u. a. Higher Incidence of Mild Cognitive Impairment in Familial Hypercholesterolemia. *Am J Med*.
-

- März 2010;123(3):267–74.
40. Reed B, Villeneuve S, Mack W, DeCarli C, Chui HC, Jagust W. Associations between serum cholesterol levels and cerebral amyloidosis. *JAMA Neurol.* Februar 2014;71(2):195–200.
 41. Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA. Statins and the risk of dementia. *Lancet.* 2000;356(9242):1627–31.
 42. Tall AR, Yvan-Charvet L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. Bd. 15, *Nature Reviews Immunology.* NIH Public Access; 2015. S. 104–16.
 43. Schmidt R, Schmidt H, Curb JD, Masaki K, White LR, Launer LJ. Early inflammation and dementia: A 25-year follow-up of the Honolulu-Asia Aging Study. *Ann Neurol.* 2002;52(2):168–74.
 44. McGeer EG, McGeer PL. The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease. Bd. 33, *Experimental Gerontology.* 1998. S. 371–8.
 45. Perry VH, Newman TA, Cunningham C. The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci.* 2003;
 46. Cermenati G, Mitro N, Audano M, Melcangi RC, Crestani M, De Fabiani E, u. a. Lipids in the nervous system: From biochemistry and molecular biology to patho-physiology. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 1. Januar 2015;1851(1):51–60.
 47. Yamashita A, Sugiura T, Waku K. Acyltransferases and transacylases involved in fatty acid remodeling of phospholipids and metabolism of bioactive lipids in mammalian cells. Bd. 122, *Journal of Biochemistry.* 1997. S. 1–16.
 48. Mitchell RW, Hatch GM. Fatty acid transport into the brain: Of fatty acid fables and lipid tails. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids.* 1. November 2011;85(5):293–302.
 49. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. Bd. 89, *Cell.* 1997. S. 331–40.
 50. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, u. a. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev.* 15. November 2000;14(22):2819–30.
 51. Horton JD, Shimomura I, Brown MS, Hammer RE, Goldstein JL, Shimano H. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J Clin Invest.* 1998;101(11):2331–9.
 52. Shimomura I, Bashmakov Y, Horton JD. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem.* 15. Oktober 1999;274(42):30028–32.
 53. Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, u. a. Role of LXRs in control of
-

- lipogenesis. *Genes Dev.* 15. November 2000;14(22):2831–8.
54. Bolsoni-Lopes A, Alonso-Vale MIC. Lipolysis and lipases in white adipose tissue – An update. *Arch Endocrinol Metab.* August 2015;59(4):335–42.
55. Adeva-Andany MM, Carneiro-Freire N, Seco-Filgueira M, Fernández-Fernández C, Mouriño-Bayolo D. Mitochondrial β -oxidation of saturated fatty acids in humans. *Mitochondrion.* 15. März 2018;
56. Hu T, Foxworthy P, Siesky A, Ficorilli J V., Gao H, Li S, u. a. Hepatic peroxisomal fatty acid β -oxidation is regulated by liver X receptor α . *Endocrinology.* 1. Dezember 2005;146(12):5380–7.
57. Petr M, Stastny P, Zajac A, Tufano JJ. The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Their Transcriptional Coactivators Gene Variations in Human Trainability : A Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 15. Mai 2018;19(5):1472.
58. Kelly D, Editor G, Marx N, Duez H, Fruchart J, Staels B. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Atherogenesis. *Circ Res.* 2004;94(9):1168–78.
59. Heneka MT, Landreth GE. PPARs in the brain. Bd. 1771, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids.* Elsevier; 2007. S. 1031–45.
60. Song S, Attia RR, Connaughton S, Niesen MI, Ness GC, Elam MB, u. a. Peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARalpha) and PPAR gamma coactivator (PGC-1alpha) induce carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT-1A) via independent gene elements. *Mol Cell Endocrinol.* 30. August 2010;325(1–2):54–63.
61. Dutchak PA, Katafuchi T, Bookout AL, Choi JH, Yu RT, Mangelsdorf DJ, u. a. Fibroblast growth factor-21 regulates PPAR γ activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones. *Cell.* 3. Februar 2012;148(3):556–67.
62. Woo YC, Xu A, Wang Y, Lam KSL. Fibroblast Growth Factor 21 as an emerging metabolic regulator: Clinical perspectives. Bd. 78, *Clinical Endocrinology.* Wiley/Blackwell (10.1111); 2013. S. 489–96.
63. Sarruf DA, Thaler JP, Morton GJ, German J, Fischer JD, Ogimoto K, u. a. Fibroblast growth factor 21 action in the brain increases energy expenditure and insulin sensitivity in obese rats. *Diabetes.* Juli 2010;59(7):1817–24.
64. Shang W, Yu X, Wang H, Chen T, Fang Y, Yang X, u. a. Fibroblast growth factor 21 enhances cholesterol efflux in THP-1 macrophage-derived foam cells. Bd. 11, *Molecular Medicine Reports.* D.A. Spandidos; 2015. 503-508 S.
65. Lin Z, Pan X, Wu F, Ye D, Zhang Y, Wang Y, u. a. Fibroblast growth factor 21 prevents atherosclerosis by suppression of hepatic sterol regulatory element-binding protein-2 and induction of adiponectin in mice. *Circulation.* 26. Mai 2015;131(21):1861–71.
66. Kharitonov A, Shiyanova TL, Koester A, Ford AM, Micanovic R, Galbreath EJ, u. a.
-

- FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest*. Juni 2005;115(6):1627–35.
67. Inagaki T, Dutchak P, Zhao G, Ding X, Gautron L, Parameswara V, u. a. Endocrine Regulation of the Fasting Response by PPAR α -Mediated Induction of Fibroblast Growth Factor 21. *Cell Metab*. 6. Juni 2007;5(6):415–25.
68. Adams AC, Cheng CC, Coskun T, Kharitonov A. FGF21 Requires β klotho to Act In Vivo. *PLoS One*. 2012;7(11):e49977.
69. Chau MDL, Gao J, Yang Q, Wu Z, Gromada J. Fibroblast growth factor 21 regulates energy metabolism by activating the AMPK-SIRT1-PGC-1 α pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 13. Juli 2010;107(28):12553–8.
70. Wang Y, Dang N, Sun P, Xia J, Zhang C, Pang S. The effects of metformin on fibroblast growth factor 19, 21 and fibroblast growth factor receptor 1 in high-fat diet and streptozotocin induced diabetic rats. *Endocr J*. 2017;64(5):543–52.
71. Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, Koukos G, Flier JS, Maratos-Flier E. Hepatic Fibroblast Growth Factor 21 Is Regulated by PPAR α and Is a Key Mediator of Hepatic Lipid Metabolism in Ketotic States. Bd. 5, *Cell Metabolism*. Cell Press; 2007. S. 426–37.
72. Kuhla A, Lange S, Holzmann C, Maass F, Petersen J, Vollmar B, u. a. Lifelong Caloric Restriction Increases Working Memory in Mice. *PLoS One*. 2013;8(7):e68778.
73. Gillette-Guyonnet S, Vellas B. Caloric restriction and brain function. Bd. 11, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2008. S. 686–92.
74. Rühlmann C, Wölk T, Blümel T, Stahn L, Vollmar B, Kuhla A. Long-term caloric restriction in ApoE-deficient mice results in neuroprotection via Fgf21-induced AMPK/mTOR pathway. *Aging (Albany NY)*. 29. November 2016;8(11):2777–89.
75. Watanabe R, Wei L, Huang J. mTOR Signaling, Function, Novel Inhibitors, and Therapeutic Targets. *J Nucl Med*. 1. April 2011;52(4):497–500.
76. Cai Z, Zhou Y, Xiao M, Yan L-J, He W. Activation of mTOR: a culprit of Alzheimer's disease? *Neuropsychiatr Dis Treat*. April 2015;1015.
77. Caccamo A, Magri A, Medina DX, Wisely E V, López-Aranda MF, Silva AJ, u. a. mTOR REGULATES TAU PHOSPHORYLATION AND DEGRADATION: IMPLICATIONS FOR ALZHEIMER'S DISEASE AND OTHER TAUOPATHIES. *Aging Cell*. 2013;12(3):370–80.
78. Siman R, Cocca R, Dong Y. The mTOR Inhibitor Rapamycin Mitigates Perforant Pathway Neurodegeneration and Synapse Loss in a Mouse Model of Early-Stage Alzheimer-Type Tauopathy. Ginsberg SD, Herausgeber. *PLoS One*. 5. November 2015;10(11):e0142340.
79. Thomas I, Gregg B. Metformin; a review of its history and future: from lilac to longevity. *Pediatr Diabetes*. 2017;18(1):10–6.
-

80. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* (London, England). 12. September 1998;352(9131):854–65.
 81. Andersen SE, Christensen M. Hypoglycaemia when adding sulphonylurea to metformin: a systematic review and network meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol*. 2016;129:1–302.
 82. Ng TP, Feng L, Yap KB, Lee TS, Tan CH, Winblad B. Long-Term Metformin Usage and Cognitive Function among Older Adults with Diabetes. *J Alzheimer's Dis*. 4. Juni 2014;41(1):61–8.
 83. Imfeld P, Bodmer M, Jick SS, Meier CR. Metformin, other antidiabetic drugs, and risk of Alzheimer's disease: A population-based case-control study. *J Am Geriatr Soc*. 2012;60(5):916–21.
 84. Moore EM, Mander AG, Ames D, Kotowicz MA, Carne RP, Brodaty H, u. a. Increased Risk of Cognitive Impairment in Patients With Diabetes Is Associated With Metformin. *Diabetes Care*. 1. Oktober 2013;36(10):2981–7.
 85. Pintana H, Apaijai N, Pratchayasakul W, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Effects of metformin on learning and memory behaviors and brain mitochondrial functions in high fat diet induced insulin resistant rats. *Life Sci*. 5. Oktober 2012;91(11–12):409–14.
 86. Nygaard EB, Vienberg SG, Ørskov C, Hansen HS, Andersen B. Metformin Stimulates FGF21 Expression in Primary Hepatocytes. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:1–8.
 87. Buzello M. The Apolipoprotein E Knockout Mouse: A Model Documenting Accelerated Atherogenesis In Uremia. *J Am Soc Nephrol*. 1. Februar 2003;14(2):311–6.
 88. Zhang X, Yeung DCY, Karpisek M, Stejskal D, Zhou ZG, Liu F, u. a. Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes*. 1. Mai 2008;57(5):1246–53.
 89. Coskun T, Bina HA, Schneider MA, Dunbar JD, Hu CC, Chen Y, u. a. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology*. 2008;149(12):6018–27.
 90. Malin SK, Kashyap SR. Effects of metformin on weight loss: potential mechanisms. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2014;21(5):323–9.
 91. Fon Tacer K, Bookout AL, Ding X, Kurosu H, John GB, Wang L, u. a. Research Resource: Comprehensive Expression Atlas of the Fibroblast Growth Factor System in Adult Mouse. *Mol Endocrinol*. 2010;24(10):2050–64.
 92. Von Holstein-Rathlou S, Bondurant LD, Peltekian L, Naber MC, Yin TC, Claflin KE, u. a. FGF21 mediates endocrine control of simple sugar intake and sweet taste preference by the liver. *Cell Metab*. 2016;23(2):335–43.
 93. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*.
-

- 2005;1(1):15–25.
94. Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LGD, Müller C, Carling D, u. a. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*. 17. Januar 2002;415(6869):339–43.
 95. Taïb B, Bouyakdan K, Hryhorczuk C, Rodaros D, Fulton S, Alquier T. Glucose regulates hypothalamic long-chain fatty acid metabolism via AMP-activated kinase (AMPK) in neurons and astrocytes. *J Biol Chem*. 27. Dezember 2013;288(52):37216–29.
 96. de Oliveira Santana KN, Lelis DF, Mendes KL, Lula JF, Paraíso AF, Andrade JMO, u. a. Metformin Reduces Lipogenesis Markers in Obese Mice Fed a Low-Carbohydrate and High-Fat Diet. *Lipids*. 1. Dezember 2016;51(12):1375–84.
 97. Gaudreault N, Kumar N, Posada JM, Stephens KB, Reyes de Mochel NS, Eberlé D, u. a. ApoE suppresses atherosclerosis by reducing lipid accumulation in circulating monocytes and the expression of inflammatory molecules on monocytes and vascular endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Februar 2012;32(2):264–72.
 98. Krimbou L, Denis M, Haidar B, Carrier M, Marcil M, Genest J. Molecular interactions between apoE and ABCA1. *J Lipid Res*. 2004;45(5):839–48.
 99. Boehm-Cagan A, Bar R, Harats D, Shaish A, Levkovitz H, Bielicki JK, u. a. Differential Effects of apoE4 and Activation of ABCA1 on Brain and Plasma Lipoproteins. Lakshmana MK, Herausgeber. *PLoS One*. 8. November 2016;11(11):e0166195.
 100. Joyce CW, Amar MJA, Lambert G, Vaisman BL, Paigen B, Najib-Fruchart J, u. a. The ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) modulates the development of aortic atherosclerosis in C57BL/6 and apoE-knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8. Januar 2002;99(1):407–12.
 101. Desikan RS, Schork AJ, Wang Y, Thompson WK, Dehghan A, Ridker PM, u. a. Polygenic Overlap Between C-Reactive Protein, Plasma Lipids, and Alzheimer Disease. *Circulation*. 9. Juni 2015;131(23):2061–9.
 102. Lewis DK, Bake S, Thomas K, Jezierski MK, Sohrabji F. A high cholesterol diet elevates hippocampal cytokine expression in an age and estrogen-dependent manner in female rats. *J Neuroimmunol*. Juni 2010;223(1–2):31–8.
 103. Ali K, Middleton M, Puré E, Rader DJ. Apolipoprotein E suppresses the type I inflammatory response in vivo. *Circ Res*. 2005;97(9):922–7.
 104. Díaz-Delfín J, Hondares E, Iglesias R, Giral M, Caelles C, Villarroya F. TNF- α represses β -klotho expression and impairs FGF21 action in adipose cells: Involvement of JNK1 in the FGF21 pathway. *Endocrinology*. 2012;153(9):4238–45.
 105. Olmos G, Lladó J. Tumor necrosis factor alpha: A link between neuroinflammation and excitotoxicity. Bd. 2014, *Mediators of Inflammation*. Hindawi Limited; 2014. S. 861231.
-

106. Ge X, Wang Y, Lam KS, Xu A. Metabolic actions of FGF21: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Acta Pharm Sin B*. 2012;2(4):350–7.
 107. Adams AC, Yang C, Coskun T, Cheng CC, Gimeno RE, Luo Y, u. a. The breadth of FGF21's metabolic actions are governed by FGFR1 in adipose tissue. *Mol Metab*. 2013;2(1):31–7.
 108. Ge X, Chen C, Hui X, Wang Y, Lam KSL, Xu A. Fibroblast growth factor 21 induces glucose transporter-1 expression through activation of the serum response factor/Ets-like protein-1 in adipocytes. *J Biol Chem*. 7. Oktober 2011;286(40):34533–41.
 109. Shah K, Desilva S, Abbruscato T. The role of glucose transporters in brain disease: diabetes and Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 3. Oktober 2012;13(10):12629–55.
 110. Liu Y, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong C-X. Brain glucose transporters, O-GlcNAcylation and phosphorylation of tau in diabetes and Alzheimer's disease. *J Neurochem*. Oktober 2009;111(1):242–9.
 111. Vogelsang P, Giil LM, Lund A, Vedeler CA, Parkar AP, Nordrehaug JE, u. a. Reduced glucose transporter-1 in brain derived circulating endothelial cells in mild Alzheimer's disease patients. *Brain Res*. Januar 2018;1678:304–9.
 112. Barini E, Antico O, Zhao Y, Asta F, Tucci V, Catelani T, u. a. Metformin promotes tau aggregation and exacerbates abnormal behavior in a mouse model of tauopathy. *Mol Neurodegener*. 9. Dezember 2016;11(1):16.
 113. Julien C, Tremblay C, Phivilay A, Berthiaume L, Émond V, Julien P, u. a. High-fat diet aggravates amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD mouse model. *Neurobiol Aging*. 1. September 2010;31(9):1516–31.
 114. Riemann D, Wallrafen R, Dresbach T. The Kohlschütter-Tönz syndrome associated gene Rogdi encodes a novel presynaptic protein. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–14.
 115. Tanokashira D, Kurata E, Fukuokaya W, Kawabe K, Kashiwada M, Takeuchi H, u. a. Metformin treatment ameliorates diabetes-associated decline in hippocampal neurogenesis and memory via phosphorylation of insulin receptor substrate 1. *FEBS Open Bio*. Juli 2018;8(7):1104–18.
 116. 380050 - C57BL/6J DIO [Internet]. [zitiert 23. September 2018]. Verfügbar unter: <https://www.jax.org/strain/380050>
 117. Markowicz-Piasecka M, Sikora J, Szydłowska A, Skupień A, Mikiciuk-Olasik E, Huttunen KM. Metformin – a Future Therapy for Neurodegenerative Diseases. *Pharm Res*. 6. Dezember 2017;34(12):1–14.
 118. Chiang MC, Cheng YC, Chen SJ, Yen CH, Huang RN. Metformin activation of AMPK-dependent pathways is neuroprotective in human neural stem cells against Amyloid-beta-induced mitochondrial dysfunction. *Exp Cell Res*. 1. Oktober 2016;347(2):322–31.
-

119. Chung MM, Chen YL, Pei D, Cheng YC, Sun B, Nicol CJ, u. a. The neuroprotective role of metformin in advanced glycation end product treated human neural stem cells is AMPK-dependent. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 1. Mai 2015;1852(5):720–31.
120. Wahlqvist ML, Lee MS, Chuang SY, Hsu CC, Tsai HN, Yu SH, u. a. Increased risk of affective disorders in type 2 diabetes is minimized by sulfonylurea and metformin combination: A population-based cohort study. *BMC Med.* 29. November 2012;10:150.
121. Blum HE, Müller-Wieland D. *Klinische Pathophysiologie.* 10. Georg Thieme Verlag KG; 2018. 225-226 S.

VII. **THESEN**

1. Metformin führt zum Anstieg der FGF21-Plasmakonzentration.
2. Ähnlich wie die Kalorienrestriktion führt die Einnahme von Metformin via FGF21 zur Hemmung von mTOR.
3. Metformin besitzt möglicherweise neurodegenerative Eigenschaften.
4. Im Vergleich zum Wildtyp dient die ApoE^{-/-} Maus aufgrund erhöhter pTau Werte als Tiermodell für neurodegenerative Erkrankungen.
5. Die ApoE^{-/-} Maus weist im Vergleich zum Wildtyp eine Dyslipidämie im Sinne einer Hypercholesterinämie auf.
6. Eine Dyslipidämie ist mit einer erhöhten Neuroinflammation assoziiert.
7. Metformin zeigt in der ApoE^{-/-} Maus eine lipogene Wirkung mit konsekutivem Anstieg der Neuroinflammation.
8. Eine Neuroinflammation führt zu einem Neuronen- sowie Synapsenverlust und folglich zu einer Progredienz der AD.
9. Chronische Entzündungen können zu einer FGF21 Resistenz führen, welche durch Metformin verstärkt wird.
10. Die FGF21 Resistenz wird vermutlich über die Hemmung von β -Klotho vermittelt.

VIII. **DANKSAGUNG**

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar für die Möglichkeit an Ihrem Institut zu promovieren und für Ihre konstruktive Hinweise beim Anfertigen der Arbeit.

Mein außerordentlicher Dank gilt meiner Betreuerin PD Dr. rer. nat. Angela Kuhla, nicht nur für die spannende Themenvergabe, sondern auch für Ihre umfassende Betreuung und Unterstützung während meiner gesamten Promotionszeit. Sie hatte stets ein offenes Ohr für mich und unterstützte mich bei jeglichen Problemen. Ich bin sehr dankbar für die lehrreiche Zeit und für Ihre Engelsgeduld, die sie mir vor allem beim Korrekturlesen der Arbeit entgegen brachte.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für experimentelle Chirurgie bedanken. Sie haben mich fachlich sowie persönlich bei der Tierhaltung, der Durchführung sämtlicher Analyseverfahren und der Anfertigung der histologischen Präparate unterstützt.

Mein tiefster Dank gilt meiner Familie, die mich bis heute so unermüdlich in allem unterstützen. Der Weg bis hierher war teils steinig, doch sie gaben mir die nötige Kraft meine Ziele zu verwirklichen. Ohne sie hätte ich all das nicht erreicht und wäre um so viele tolle Erfahrungen ärmer.

Des Weiteren möchte ich meinem Freund Meinolf Ebberts zu tiefst danken, der mir während der Erstellung dieser Dissertationsschrift stets eine Stütze war und mir bei allen Höhen und Tiefen zur Seite stand. Ein großer Dank gilt auch meinen Freunden, die mich schon so viele Jahre auf meinem Weg begleiten und mir immer wieder Mut zugesprochen haben.

IX. **LEBENS LAUF**

Persönliche Daten

Geburtsdatum / Geburtsort:	03.08.1987 in Berlin
Anschrift:	Neptunallee 7, 18057 Rostock
Kontaktdaten:	Tel. 0049 17621044308
	E-Mail: elaine.brichmann@googlemail.com

Bildungsweg

10/2013 – 12/2017	Studium der Humanmedizin, klinischer Abschnitt Universität Rostock
09/2010 – 05/2012	Studium der Humanmedizin, vorklinischer Abschnitt Universität Pécs, Ungarn
05/2008 – 04/2010	Ausbildung zur Rettungsassistentin NAW Berlin & Promedica Rettungsdienst GmbH, Werder
08/2004 – 07/2007	Lise-Meitner Schule, Berlin Abschluss: Abitur
08/2003 – 06/2004	Rainier High School, Rainer, Washington, USA

Promotion

06/2015 – heute	Die Wirkung von Metformin auf neurodegenerative Prozesse in der ApoE-/- Maus Prof. Dr. B. Vollmar, PD Dr. Angela Kuhla, Rudolf-Zenker- Institut für Experimentelle Chirurgie, Universitätsmedizin Rostock
-----------------	---

Praktisches Jahr

07/2017 – 10/2017	Abteilung für Neurochirurgie (Wahltertial) Universitätsmedizin Rostock
03/2017 – 07/2017	Abteilungen für Unfall- und Handchirurgie, Allgemein- und Viszeralchirurgie, Neurochirurgie MediClin Krankenhaus Plau am See
11/2016 – 03/2017	Abteilung für Innere Medizin Krankenhaus Bad Doberan

Berufliche Erfahrung

09/2018 – heute	Assistenzärztin Klinik für Anästhesie und Intensivtherapie Universitätsmedizin Rostock
06/2018 – 07/2018	Assistenzärztin Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie Klinikum Südstadt Rostock
03/2017 – 12/2017	Praxisanleiterin Ausbildung von Rettungssanitätern und Notärzten Prometheus Rettungsdienst GmbH, Berlin

LEBENS LAUF

04/2010 – 12/2017

Rettungsassistentin
Promedica Rettungsdienst GmbH, Potsdam-Mittelmark

06/2011 – 10/2013

Fachdozentin
Fächer: Biologie, Anatomie, Physiologie
Prometheus Medizinische Akademie GmbH, Berlin

Elaine Brichmann
Rostock, September 2019

X. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)